

SANDRA APARECIDA MEDEIRO

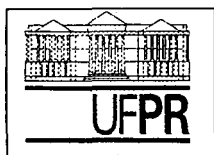
**"Moduladores da Biossíntese e do Mecanismo de
Ação do Etileno sobre o Crescimento *In Vitro*
do Porta-Enxerto de Macieira Marubakaido"**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Agronomia - Produção Vegetal, Departamento
de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Prof. Dr. Adauto Bellarmino Pereira Netto

CURITIBA

2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **SANDRA APARECIDA MEDEIRO**, sob o título "**Moduladores da Biossíntese e do Mecanismo de Ação do Etileno sobre o Crescimento *In Vitro* do Porta-Enxerto de Macieira Marubakaido**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 20 de Março de 2001.

Dr. Gerson Renan de Lucas Fortes
Primeiro Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Segundo Examinador

Professor Dr. Adauto Bellarmino Pereira Netto
Presidente da Banca e Orientador

A meus pais,
Gomercindo e Vitória

Ao meu esposo, Mauro e ao
meu filho, Lucas

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adauto Bellarmino de Pereira Netto, pela orientação, amizade, fornecimento de material de laboratório e pelo apoio na realização de todos os trabalhos durante o curso.

Ao meu esposo Mauro, pelo amor, amizade, carinho, apoio e compreensão recebidos na elaboração desta tese.

Ao Dr. Enio Luiz Pedrotti, professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo material vegetal fornecido para a realização dos experimentos e pelo apoio recebido durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Prof. Flavio Zanette, pelo apoio recebido na ocasião do ingresso no Curso de Pós-graduação e pelo apoio recebido no decorrer do curso.

À Dra. Lydia Galagovsky, do Depto. de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade de Buenos Aires, pelas moléculas de brassinosteróide cedidas para realização dos experimentos e pelas informações prestadas.

Ao Dr. Gerson Fortes da EMBRAPA Clima Temperado de Pelotas-RS, pelo apoio e auxílio de material bibliográfico.

Ao Prof. Henrique Soares Koehler, pela orientação das análises estatísticas, pela amizade e incentivo no trabalho.

Ao Prof. Luis Antonio Biasi, por todo apoio e orientação recebida durante o curso.

À Prof^a. Marguerite Quoirin, pelo empréstimo de material de laboratório e apoio no desempenho dos trabalhos.

Aos meus pais por todo apoio e carinho recebido durante toda minha existência.

Aos amigos Solange de Paula, Hugo Habery, Luciana Ribas, Priscila, Maristela do Nascimento, Lucimara e Claudia Teles pelo apoio e amizade recebidos.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Agrárias de UFPR, pelo auxílio na busca de material bibliográfico, especialmente à Simone, pelo auxílio na revisão e correções das referências bibliográficas.

À estagiária Cintia da Universidade de São Carlos-SP, pela amizade e apoio na realização dos experimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa sem a qual não seria possível a realização do curso.

A minha sogra Cecília Lourenzon Schipani, pelo carinho, apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

A minha tia Iracema Teixeira por todo amor, carinho e apoio durante minha vida estudantil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DO PORTA-ENXERTO MARUBAKAIDO.....	3
2.2 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA MACIEIRA.....	3
2.3 DOMINÂNCIA APICAL.....	5
2.4 METABOLISMO DO ETILENO.....	6
2.5 ETILENO NOS TECIDOS E ÓRGÃOS DE ÁRVORES FRUTÍFERAS CULTIVADAS A CAMPO (<i>EX-VITRO</i>).....	8
2.6 ETILENO NOS TECIDOS E ÓRGÃOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	9
2.7 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO.....	10
2.8 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO.....	10
2.8.1 Tiossulfato de Prata.....	10
2.8.2 1-Metilciclopropano (1-MCP).....	11
2.9 BRASSINOESTERÓIDES.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 ORIGEM E MULTIPLICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	13
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	13
3.3 EXPERIMENTOS COM INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO.....	13
3.4 EXPERIMENTO COM INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO.....	14
3.4.1 Tiossulfato de Prata (STS).....	14
3.4.2 1-Metilciclopropano.....	15
3.5 EXPERIMENTOS COM BRASSINOESTERÓIDE.....	15

3.6 VARIÁVEIS AVALIADAS.....	16
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 COMPRIMENTO DO RAMO PRINCIPAL E LATERAL PRIMÁRIO.....	19
4.1.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO.....	19
4.1.1.1 Efeito do L- α -(2-aminoetoxivinil)-glicina (AVG).....	19
4.1.1.2 Efeito do Dicloreto de Cobalto (CoCl ₂)	20
4.1.1.3 Efeito do Ácido α -aminoisobutírico (AIB).....	22
4.1.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO.....	23
4.1.2.1 Efeito do Tiosulfato de Prata (STS).....	23
4.1.2.2 Efeito do 1-metilciclopropano.....	24
4.1.3 BRASSINOESTERÓIDES.....	26
4.1.3.1 28-Homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS).....	26
4.1.3.2 28-Homoetilcastasterona (28-HCTS).....	26
4.2 NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS.....	29
4.2.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO.....	29
4.2.1.1 L- α -(2-aminoetoxivinil)-glicina (AVG).....	29
4.2.1.2 Dicloreto de Cobalto (CoCl ₂)	31
4.2.1.3 Ácido α -aminoisobutírico (AIB).....	33
4.2.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO.....	34
4.2.2.1 Tiosulfato de Prata (STS).....	34
4.2.2.2 1-Metilciclopropano.....	36
4.2.3 BRASSINOSTERÓIDES.....	38
4.2.3.1 28-Homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS).....	38
4.2.3.2 28-Homoetilcastasterona (28-HCTS).....	40
4.3 TAXA DE MULTIPLICAÇÃO.....	41
4.3.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO.....	41
4.3.1.1 L- α -(2-aminoetoxivinil)-glicina (AVG).....	41

4.3.1.2 Dicloreto de Cobalto (CoCl ₂).....	43
4.3.1.3 Ácido α-aminoisobutírico (AIB).....	44
4.3.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO.....	45
4.3.2.1 Tiosulfato de Prata (STS).....	45
4.3.2.2 1-Metilciclopropano.....	46
4.3.3 BRASSINOESTERÓIDES.....	47
4.3.3.1 28-Homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS)	47
4.3.3.2 28-Homoetilcastasterona (28-HCTS)	48
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1a. ROTA METABÓLICA DO ETILENO E PASSOS ONDE ATUAM AS ENZIMAS CATALISADORAS DA SUA SÍNTESE.....	7
FIGURA 1b. ROTA METABÓLICA DO ETILENO E PASSOS ONDE ATUAM OS INIBIDORES DE SUA BIOSÍNTESE E DE SEU MECANISMO DE AÇÃO EMPREGADOS NESTE ESTUDO.....	8
FIGURA 2. ESTRUTURA MOLECULAR DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS).....	17
FIGURA 3. ESTRUTURA MOLECULAR DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS).....	17
FIGURA 4. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	18
FIGURA 5. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl ₂) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	20
FIGURA 6. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	21
FIGURA 7. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	22
FIGURA 8. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO	

DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	24
FIGURA 9. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	26
FIGURA 10. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	27
FIGURA 11. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	28
FIGURA 12. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	29
FIGURA 13. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	30
FIGURA 14. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	31
FIGURA 15. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	32
FIGURA 16. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O NÚME- RO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉRE-	

AS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i> ...	33
FIGURA 17. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	34
FIGURA 18. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	35
FIGURA 19. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	36
FIGURA 20. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	36
FIGURA 21. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	38
FIGURA 22. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	38
FIGURA 23. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	39

FIGURA 24. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS <i>IN VITRO</i>	40
FIGURA 25. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.....	41
FIGURA 26. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl ₂) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.....	42
FIGURA 27. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁ- RIO.....	43
FIGURA 28. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.....	44
FIGURA 29. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁ- RIOS.....	45
FIGURA 30. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.....	47
FIGURA 31. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁ- RIOS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPM - Associação Brasileira de Produtores de Maçã

ACC - Ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico

ACS - ACC- sintase

ACO - ACC- oxidase

AIB - Ácido α -aminoisobutírico

AgNO₃ - Nitrato de prata

AOA - Ácido aminooxi-acético

AVG - L- α - (2-aminoetoxivinil) glicina

BAP- Benzilaminopurina

BRs - Brassinoesteróides

CoCl₂ - Dicloreto de cobalto

EBPs - Proteínas que se ligam ao etileno

EFE - Enzima formadora do etileno

FAO - “Food and Agriculture Organization”

GACC - Ácido (1- γ - glutamina) ciclopropano

28-HCTS - 28-Homoetilcastasterona

5F-HCTS - 28-Homoetil-5-flúor-castasterona

MACC - N-malonil-ACC

1-MCP- 1- Metilciclopropano

SAM - S-adenosil metionina

STS - Tiosulfato de prata

TM - Taxa de multiplicação

RESUMO

A utilização de frascos de cultura com tampas que dificultam trocas gasosas entre o ambiente interno e externo dos frascos resulta em aumento considerável na concentração interna de etileno nos frascos de cultura, o que frequentemente ocasiona redução na taxa de multiplicação de material vegetal *in vitro*. A redução da concentração do etileno na atmosfera interna dos frascos de cultura, por meio de inibição da biossíntese, ou da inibição do seu mecanismo de ação, tem promovido o aumento na taxa de multiplicação, o que reduz o tempo e o custo de produção de mudas micropropagadas. Neste trabalho, objetivou-se aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira Marubakaido pelo uso de compostos conhecidos por inibir a biossíntese ou o mecanismo de ação do etileno. Segmentos nodais de *Malus prunifolia* cv Marubakaido cultivado *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 2,22 μM de Benzilaminopurina, e mantidos em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, Densidade de Fluxo de Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e umidade relativa do ar de $75 \pm 5\%$. AVG (L- α -(2-aminoetoxivinil-glicina), AIB (ácido α -aminoisobutírico), CoCl_2 (dicloreto de cobalto), e os brassinoesteróides 28-HCTS (homoetilcastasterona) e 5F-HCTS (28-homoetil-5-flúor-casterona), compostos moduladores da biossíntese do etileno, além de STS (tiosulfato de prata) e 1-MCP (1-metilciclopropano), conhecidos inibidores do mecanismo de ação do etileno foram empregados neste estudo, pela adição à atmosfera interna do frasco de cultivo, no caso do 1-MCP, e de aplicação foliar, no caso dos brassinoesteróides, ou pela adição ao meio de cultura, no caso dos demais compostos químicos mencionados. As variáveis avaliadas foram: comprimento das partes aéreas e sua hierarquia; número de partes aéreas medindo 1,5 cm de comprimento ou mais e partes aéreas medindo menos de 1,5 cm, com identificação de sua hierarquia; e taxa de multiplicação dos explantes (número de segmentos nodais e ápices caulinares, aptos a multiplicação *in vitro*). Os resultados obtidos mostraram que, dentre as variáveis avaliadas, o número de ramos principais $< 1,5$ cm apresentou aumento da ordem de 74% quando o AVG estava presente na concentração de 5 μM no meio de cultura. Para o CoCl_2 , houve redução significativa em todas as variáveis avaliadas. Nenhuma alteração significativa foi encontrada para comprimento de ramos, número de ramos laterais ou taxa de multiplicação quando o AIB estava presente no meio de cultura. Para os tratamentos com 1-MCP e STS, os resultados apontaram para redução na taxa de multiplicação do material vegetal. Dentre os brassinoesteróides testados, somente o 5F-HCTS apresentou respostas significativas. Aumento da ordem de 83% na taxa de multiplicação do ramo principal mostrou-se relacionado à dose de 1 $\mu\text{g.parte aérea}^{-1}$ do 5F-HCTS, tendo também sido observada elevação da ordem de 52% no número de ramos laterais $\geq 1,5$ cm nesta dose de 5F-HCTS. Concluindo, o brassinoesteróide 5F-HCTS apresenta potencial para ser utilizado com o objetivo de aprimorar a técnica de propagação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira Marubakaido.

Palavras-chave: etileno, taxa de multiplicação, *Malus prunifolia*, brassinoesteróide.

ABSTRACT

Lids used in culture vessels usually constrain gas exchange between the inner and outer vessel's atmosphere. This constrain typically leads to a considerable raise in the internal ethylene concentration which often cause reduction on the multiplication rate for *in vitro*-grown tissues. Reduction on the internal ethylene concentration through the inhibition of the growth regulator biosynthesis or signal transduction pathway has increased multiplication rate (MR) in various systems. This increase on MR reduce micropropagation cost and time. This study aimed to increase *in vitro* MR for the Marubakaido apple rootstock through the use of compounds known to inhibit ethylene biosynthesis or signal transduction pathway. Nodal segments of a clone of *Malus prunifolia* cv Marubakaido were grown in MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) culture medium supplemented with 2,22 μM benzylaminopurine. Explants were kept in growth room at $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-hours photoperiod, photosynthetic photon flux density (PPFD) of $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, at the culture level, and relative humidity at $75 \pm 5\%$. AVG (L- α -(2-aminoethoxyvinyl)-glycine), AIB (α -amino isobutyric acid), CoCl_2 (cobalt dichlorate), and brassinosteroids 28-HCTS (homoethylcastasterone) and 5F-HCTS (28-homoethyl-5-fluor-castasterone), inhibitors of ethylene biosynthesis, and STS (silver thiosulphate) and 1-MCP (1-methylcyclopropane), well known inhibitors of the ethylene signal transduction pathway were used in this study through the addition to the culture vessel's internal atmosphere, in the case of 1-MCP, through leaf application, in the case of brassinosteroids, or through the addition to the culture media, in the case of the other mentioned chemicals. Evaluation consisted of measurements of shoot length and their hierarchy distribution, number of shoots measuring 1,5 cm or more in length, number of shoots measuring less than 1,5 cm in length, also with their hierarchy distribution, and multiplication rate (number of shoot apices and nodal segments useful for micropropagation purposes). A 74% increase on the number of main branches $< 1,5$ cm was related to the presence of AVG at 5 μM in the culture medium. No significant change for any of the measured parameters was found for shoots grown in CoCl_2 or AIB-containing media. Reduction on MR was found for all of the 1-MCP and STS treatments. Among the brassinosteroids, only 5F-HCTS induced significant changes on shoot growth dynamics. An 83% increase on MR was related to the dose of 1 $\mu\text{g.shoot}^{-1}$. This increase on MR was related to a raise of 52% on the number of lateral branches $\geq 1,5$ cm. Concluding, the 5F-HCTS shows potential to be used on the improvement of the *in vitro* propagation technique for the Marubakaido apple rootstock.

Key-words: ethylene, multiplication rate, *Malus prunifolia*, brassinosteroid

1 INTRODUÇÃO

O hemisfério norte é responsável por aproximadamente 90% da produção mundial de maçãs, sendo que a ex-União Soviética, China e Estados Unidos da América respondem, em conjunto, por cerca de 35 a 40% do volume total da produção (“Food and Agriculture Organization-FAO”, 1991).

No continente sul-americano, Argentina, Chile e Brasil respondem por 93% da produção, sendo a Argentina (2,8% da produção mundial) e Chile (1,9% da produção mundial) fortes exportadores. O Brasil é o 3º maior produtor de maçã na América do Sul (1,2% da produção mundial), sendo que sua produção destina-se principalmente ao auto-abastecimento (HENTSCHKE, 1994).

No Brasil, os principais Estados produtores localizam-se na Região Sul. O Estado de Santa Catarina detém a liderança, sendo Fraiburgo e São Joaquim os principais municípios produtores do Estado, participando com 59% da área plantada e 72% do volume de colheita no ano de 1991 (HENTSCHKE, 1992).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM), na safra 97/98, a produção de maçã atingiu 691.000 toneladas, sendo que Santa Catarina foi responsável por 52,1% da produção e Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo foram responsáveis por 42,11, 4,05 e 1,74 %, respectivamente, da produção brasileira (BORGES JUNIOR, 1998)¹. O Brasil é também o maior importador de maçã do hemisfério sul, tendo sido, em 1990, responsável por 2,8% do volume mundial de importações, contando como principal fornecedor a Argentina (HENTSCHKE, 1992). Nas operações comerciais realizadas no âmbito do Mercosul, são concedidos prazos longos e baixos custos de financiamento, o que vem estimulando grandes atacadistas a realizarem importações (PINAZZA, 1999).

O uso de porta-enxertos clonais, além de possibilitar a formação de pomares com arquitetura de copa bastante uniforme, induz à precocidade na frutificação e aumenta a

¹- Comunicação pessoal do autor.

produtividade da planta. A maximização da proliferação de partes aéreas é um dos objetivos a ser atingido durante o processo de micropropagação (BIDDINGTON, 1992), uma vez que esta proliferação de partes aéreas (brotamento lateral), possibilita o aumento da taxa de multiplicação *in vitro*. Muita atenção tem sido dispensada ao estudo do efeito dos reguladores de crescimento vegetal sobre a proliferação de partes aéreas. Todavia, o número de publicações que enfocam especificamente o alongamento de brotos laterais é pequeno. Em geral, parece que condições que estimulam indução abundante de brotos laterais, inibem a continuação do seu alongamento (DAVID, 1985).

O porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*), uma espécie de origem japonesa, adapta-se a diferentes tipos de solo, podendo ainda tolerar solos menos férteis e períodos de estiagem. Estas características fazem com que esse porta-enxerto se constitua em excelente alternativa para o sistema de produção de maçã (*Malus domestica*), uma cultura em expansão, que busca cada vez mais porta-enxertos com boa adaptabilidade e resistência a condições ambientais adversas (ZANOL *et al.*, 1996).

O presente trabalho teve por objetivo testar a hipótese de que, moduladores da biossíntese e/ou do mecanismo de ação do etileno podem estimular a proliferação de brotações laterais, ou o alongamento dos ramos principais em partes aéreas de *Malus prunifolia* crescidas *in vitro* e, conseqüentemente, aprimorar a técnica de propagação *in vitro* para este porta-enxerto de macieira.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DO PORTA-ENXERTO MARUBAKAIDO

Macieiras possuem vários nomes específicos, segundo a nomenclatura científica, tais como: *Malus pumila* Mill., *M. sylvestris* Mill., *M. malus* Britt. e *M. domestica*. Em 1803, Borkhausen (KORBAN e SKIRVIN, 1984) descreveu botanicamente a macieira cultivada e propôs o nome de *Malus domestica*, sendo este seu primeiro nome publicado, segundo o Artigo 29 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, evento este que anulou todos os nomes publicados anteriormente (RIBAS, 1991).

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST (1981), o gênero *Malus* é classificado da seguinte maneira para a cultivar Marubakaido:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Rosales

Família: Rosaceae

Gênero: *Malus*

Espécie: *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.

2.2 PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA MACIEIRA

A micropropagação pode ser definida como um método de propagação vegetativa baseado na multiplicação de uma planta *in vitro* (CHÉE, 1984). O termo “cultivo *in vitro*” cobre uma gama de técnicas que envolvem desde o crescimento sob condições assépticas de órgãos de plantas, tais como brotações, raízes ou embriões, até o cultivo de massas de células não organizadas ou calos, células isoladas ou protoplastos (WILKINS *et al.*, 1985).

Técnicas de micropropagação têm sido desenvolvidas para muitas espécies frutíferas como um dos meios mais rápidos de propagação clonal (BIDDINGTON, 1992). As técnicas de micropropagação vêm sendo apontadas como uma alternativa eficiente para a produção comercial de mudas de macieira.

A propagação vegetativa da macieira é feita tradicionalmente pela enxertia das cultivares-copa em porta-enxertos clonais obtidos pelo método de amontoa-de-cepa, um processo demorado. A propagação tradicional da macieira apresenta uma série de desvantagens, como a baixa produtividade (aproximadamente quatro porta-enxertos/ano/planta matriz), o requerimento de áreas relativamente grandes para o plantio, além de elevado custo de produção (FACHINELLO *et al.*, 1988).

O emprego de técnicas de micropropagação em escala comercial para macieira, em substituição aos métodos tradicionais, implica em aumento de custo da produção das mudas de porta-enxerto; porém, o aprimoramento da técnica de micropropagação, visando o aumento da disponibilidade de material vegetal e melhoria do enraizamento *in vitro*, juntamente com o aumento da taxa de sobrevivência durante o período de aclimação, poderá tornar economicamente viável o emprego destas técnicas para a propagação clonal comercial da macieira (ZANOL *et al.*, 1996).

Atualmente, a taxa de multiplicação e o desenvolvimento vegetativo de plântulas *in vitro* são considerados fatores limitantes para o aumento de produtividade dos laboratórios comerciais. A utilização de frascos fechados por grande parte dos laboratórios comerciais dificulta trocas gasosas entre a atmosfera interna dos frascos e a atmosfera externa, modificando a concentração de gases no interior do frasco, onde são acumulados compostos orgânicos como dióxido de carbono, etanol e também etileno, oriundos da atividade metabólica dos tecidos vegetais, o que frequentemente altera os padrões de diferenciação dos tecidos (RIGHETTI *et al.*, 1990; BIDDINGTON, 1992; MATTHYS *et al.*, 1995).

A necessidade da colocação rápida no mercado de plantas de ciclo de vida longo, geralmente arbóreas ou arbustivas, selecionadas após prolongados períodos de melhoramento genético, faz da clonagem uma alternativa muito importante e indispensável nos

dias atuais. A multiplicação *in vitro* de plantas de importância econômica em larga escala tem resultado na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseadas no princípio da linha de produção (KERBAUY, 1997).

Os programas de melhoramento genético podem ser otimizados pela utilização de técnicas de cultivo *in vitro* para propagação clonal de novas cultivares, uma vez que o método tradicional de produção de mudas de macieira por enxertia demanda muito tempo (2 anos), emprega mão-de-obra de maneira intensiva, requer considerável espaço físico, além de favorecer a propagação de material vegetal com problemas fitossanitários (SCHUCH, 1989).

A macieira foi uma das primeiras plantas lenhosas com que se obteve sucesso na aplicação das técnicas de micropropagação (OCHATT e CASO, 1983). As técnicas de micropropagação desenvolvidas para macieira permitem a multiplicação eficiente de diversos genótipos, fornecem material rejuvenescido e isento de contaminação, além de permitirem a produção de um grande número de mudas em qualquer época do ano (FORTES, 1992). Porta-enxertos de macieira respondem rapidamente às técnicas de cultivo *in vitro* (JONES, 1986; JONES e HADLOW, 1989).

2.3 DOMINÂNCIA APICAL

A dominância apical é descrita como o controle exercido pelo meristema apical da parte aérea, ou raiz de uma planta, sobre o desenvolvimento das gemas laterais (MARTIN, 1987). A dominância apical é quem determina o grau de ramificação e, conseqüentemente, a arquitetura da parte aérea da planta (CLINE, 1994). O grau de dominância é determinado em função das características genéticas, do ambiente e da idade da planta (MARTIN, 1987). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a inibição do crescimento de gemas laterais pela gema apical, todavia, o mecanismo da dominância apical ainda não está elucidado (CLINE, 1991). A inibição da dominância apical tem sido atribuída principalmente a mudanças ocorridas tanto no metabolismo como no transporte de auxina (CLINE, 1991). Se-

gundo TAMAS (1987), para que haja inibição do crescimento das gemas laterais, é essencial que a auxina seja liberada do ápice e, em seguida, transportada para os locais onde vai atuar.

Considerável atenção tem sido dispensada ao estudo do efeito de inibidores da dominância apical sobre a arquitetura de partes aéreas de diversas espécies (ZIESLIN e HALEVY, 1976). Diversos autores têm sugerido a existência de uma relação causal entre auxina e etileno, evitando o crescimento das gemas laterais (BURG e BURG, 1968a; CLINE, 1991; JOHN, 1997). RUSSEL e THIMANN (1988); OSBORNE (1989), demonstraram que a dominância apical é removida se a produção de etileno for bloqueada.

2.4 METABOLISMO DO ETILENO

Em plantas superiores, o etileno é sintetizado a partir da L- metionina. A L-metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM), pela enzima metionina adenosil transferase. No passo seguinte, a SAM é convertida a ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC-sintase. Finalmente, a ACC-oxidase, também conhecida como enzima formadora do etileno (EFE), catalisa a conversão do ACC para etileno (OSBORNE, 1989; ENGLISH *et al.*, 1995) (Figura 1).

O etileno é produzido a uma taxa que varia de 0,05 à 100 nl. g (peso fresco)⁻¹.h⁻¹, sendo seu metabolismo controlado pela regulação da produção do ACC, via ACC sintase, pela conjugação do ACC a N-malonil-ACC (MACC) ou a ácido (1-γ-L-glutamina) ciclopropano-1-carboxílico (GACC), e pela conversão do ACC a etileno através da atividade da ACC oxidase (OSBORNE, 1989). O etileno pode influenciar sua própria síntese através da estimulação (autocatálise) ou inibição (autoinibição) da produção de etileno (MATTHYS *et al.*, 1995). Em alguns tecidos de plantas, o etileno é oxidado a dióxido de carbono (CO₂), enquanto que em outros ele é incorporado ao tecido pela sua conversão a CO₂ e etilenoglicol, ocorrendo, em algumas plantas, ambos os processos ao mesmo tempo (SANDERS *et al.*, 1989; MACKEON *et al.*, 1995).

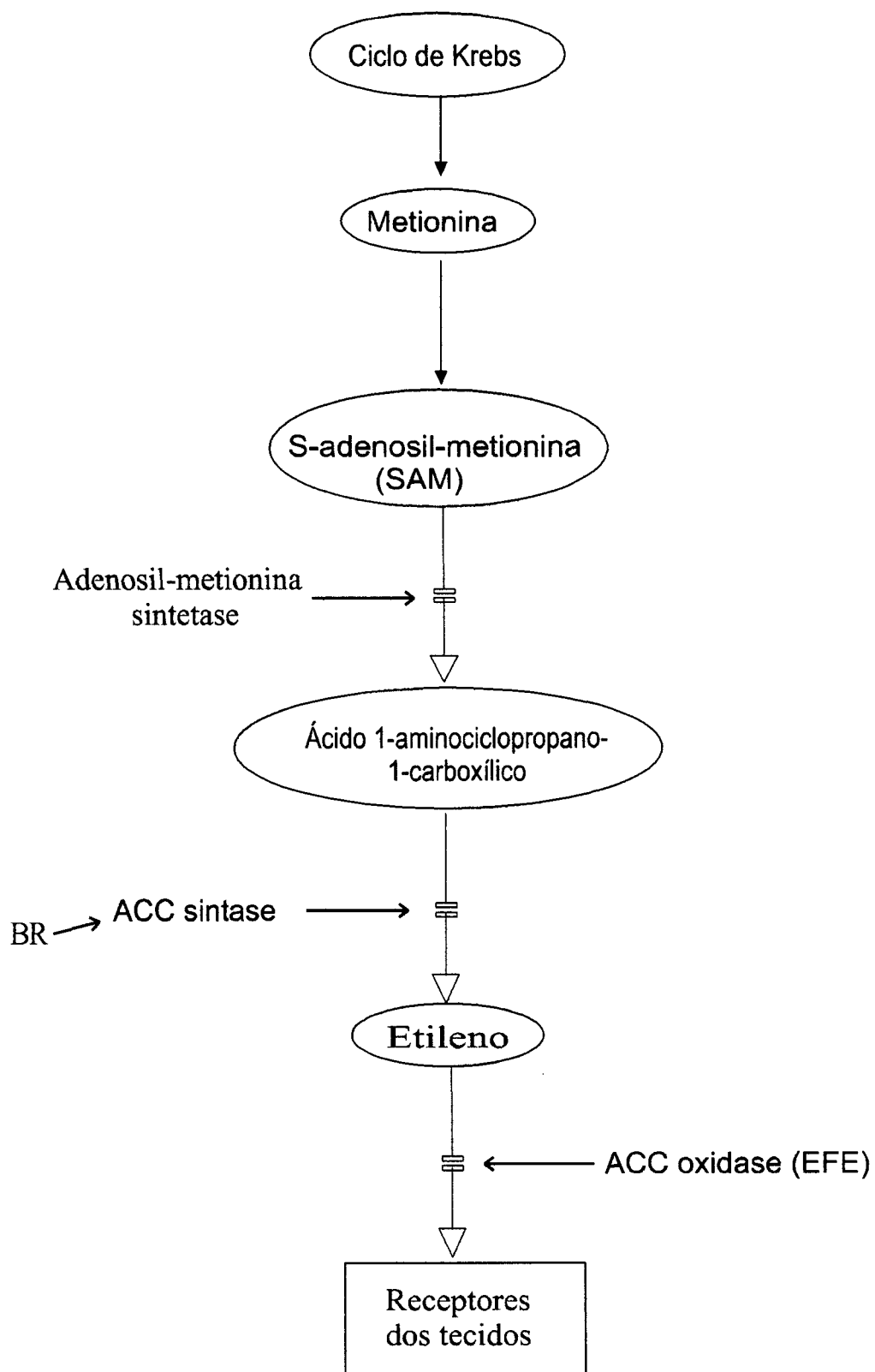


FIGURA 1a. ROTA METABÓLICA DO ETILENO E PASSOS ONDE ATUAM AS ENZIMAS CATALISADORAS DA SUA SÍNTESE E OS BRASSINOESTERÓIDES EMPREGADOS NESTE ESTUDO.

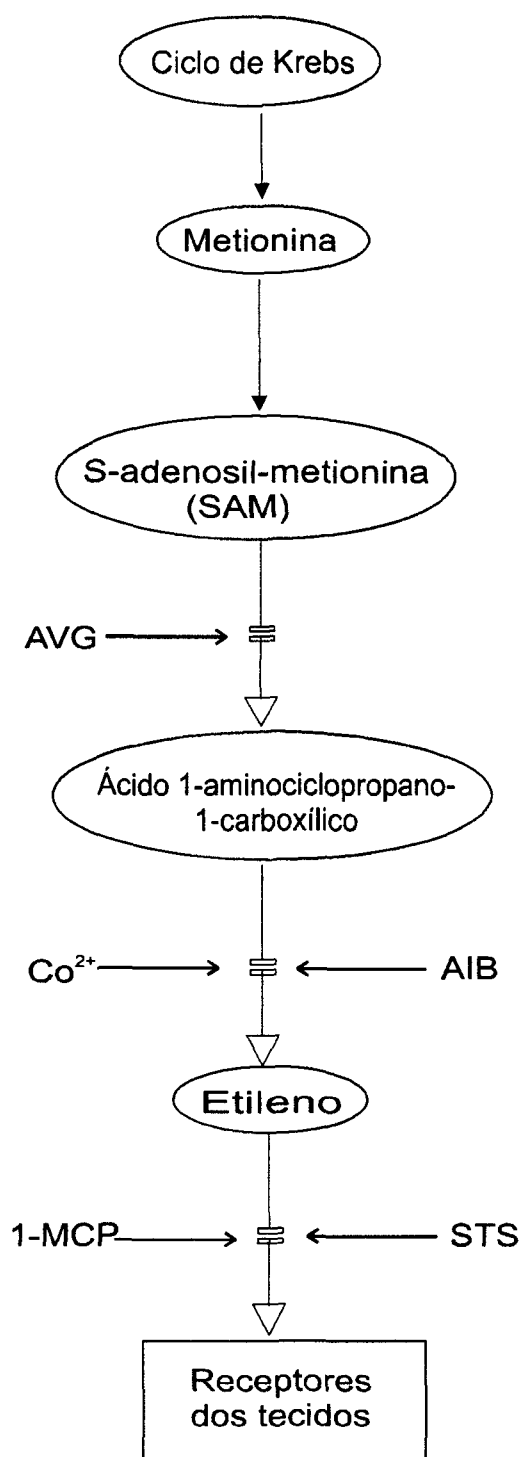


FIGURA 1b. ROTA METABÓLICA DO ETILENO E PASSOS ONDE ATUAM OS INIBIDORES DE SUA BIOSÍNTESE E DE SEU MECANISMO DE AÇÃO EMPREGADOS NESTE ESTUDO.

Segundo BURG (1968), o etileno é um hormônio regulador em concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{l.l}^{-1}$. Em alguns tecidos, no entanto, concentrações tão baixas quanto 0,01 $\mu\text{l.l}^{-1}$ são efetivas na indução de resposta hormonal (SALTVEIT e YANG, 1987). Em altas concentrações, o etileno pode causar senescência e a queda de gemas, flores e folhas (ABELES *et al.*, 1992). No entanto, estas concentrações podem ou não causar danos, dependendo da espécie, do tempo de exposição ao gás, da temperatura e do estágio de desenvolvimento da planta (ABELES *et al.*, 1992).

A produção de etileno em algumas plantas é estimulada por hormônios do grupo das auxinas (YANG e HOFFMAN, 1984), sendo que alguns dos efeitos regulatórios das auxinas podem ser mediados pelo etileno (LIEBERMAN, 1979). Também tem sido relatado que o etileno reduz os níveis endógenos de ácido indolacético (AIA) e seu transporte (RIOV e GOREN, 1979). A falta de oxigênio e tratamento com íons de prata inibem o metabolismo e a ação do etileno (BEYER *et al.*, 1984).

Os inibidores da biossíntese do etileno podem interferir em diferentes pontos da via biossintética do regulador de crescimento, reduzindo seus efeitos sobre as plantas (ADAMS e YANG, 1979).

2.5 ETILENO NOS TECIDOS E ÓRGÃOS DE ÁRVORES FRUTÍFERAS CULTIVADOS A CAMPO (*EX-VITRO*)

O desenvolvimento de ramos laterais, após o plantio no campo, é pré-requisito para que as macieiras comecem a produzir precocemente (QUINLAN e PRESTON, 1978; LOONEY, 1980; FORSHEY, 1982). No entanto, o crescimento vigoroso de árvores jovens pode causar a formação de poucos ramos laterais. Com a descoberta de que reguladores de crescimento poderiam estimular o desenvolvimento de ramos laterais (HEINICKE, 1975), foram desenvolvidos diversos estudos de indução química de brotações laterais em mudas no viveiro (QUINLAN e PRESTON, 1978; ELFVING, 1984).

A AVG (Aminoetoxivinilglicina), um inibidor da biossíntese de etileno (BAKER *et*

al., 1978), tem se mostrado capaz de induzir a quebra de dormência em gemas laterais, além de estimular o desenvolvimento posterior dos ramos laterais em plantas de macieira crescidas a campo (WILLIAMS, 1980). Experimentos realizados por CURRY e WILLIAMS (1986), onde foram empregadas plantas de macieiras com um ano de idade, demonstraram a possibilidade de se obter incremento no crescimento tanto do ramo terminal, como dos ramos laterais, após a aplicação de AVG.

2.6 ETILENO NOS TECIDOS E ÓRGÃOS CULTIVADOS *IN VITRO*

A taxa de produção de fitohormônios, como o etileno, influencia a diferenciação, a proliferação e o crescimento de células e tecidos cultivados *in vitro*, podendo promover, inibir ou não afetar a produção de brotações laterais (LAMBARDI *et al.*, 1997).

A morfogênese *in vitro* pode ser influenciada por substâncias gasosas que são biossintetizadas durante o período de cultivo *in vitro* e pelos gases que penetram no frasco durante a inoculação (RIGHETTI *et al.*, 1990). O etileno é um dos componentes mais importantes na atmosfera interna do frasco de cultivo, sendo sempre produzido pelos tecidos e células cultivados *in vitro* (RIGHETTI *et al.*, 1990). A formação do etileno, dentre outros fatores, é afetada pela capacidade fotossintética dos tecidos durante o período de incubação (INFANTE *et al.*, 1989). Antagonistas e absorventes de etileno podem ser usados para reduzir efeitos eventualmente indesejáveis do etileno sobre as plantas (LEMOES e BLAKE, 1996).

Na propagação *in vitro*, tanto o crescimento quanto a diferenciação de células e tecidos são influenciados pelo etileno, que pode se acumular em níveis fisiologicamente ativos na atmosfera interna dos frascos utilizados para propagação (RIGHETTI *et al.*, 1990; ABELES *et al.*, 1992 ; MATTHYS *et al.*, 1995). O etileno tem apresentado efeitos positivos, por exemplo, na produção de brotos adventícios em *Lilium speciosum* (GASPAR *et al.*, 1989). De acordo com MATTHYS *et al.* (1995), a produção de gemas axilares em *Gerbera jamesonii* e em *Oriza sativa* também é estimulada pela presença do etileno.

2.7 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO

Inibidores da biossíntese do etileno podem interferir em pontos diferentes na via biossintética do regulador do crescimento.

O papel do etileno em cultura de tecidos de plantas tem sido elucidado em vários sistemas por meio da adição de precursores, como o ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), e de inibidores da biossíntese do regulador de crescimento, como a aminoetoxivinilglicina (AVG), o ácido aminooxi-acético (AOA) e íons de cobalto no meio de cultura (MA *et al.*, 1998). O AVG causa inibição na produção do etileno pela inibição da enzima ACC-sintase (WILLIAMS, 1980; CURRY e WILLIAMS, 1986), a principal responsável pela regulação da biossíntese do etileno (SPIKMAN, 1989), enquanto que íons cobalto inibem a formação do etileno, pela redução da conversão do ACC a etileno (SMITH e HALL, 1984).

Em *Brassica oleracea*, a proliferação de calos é aumentada em cultura de hipocótilo pelos precursores do etileno S-adenosilmetionina (SAM) e ACC, enquanto que a iniciação da parte aérea é estimulada pelos inibidores da biossíntese do etileno AVG e CoCl_2 (SETHI *et al.*, 1990).

2.8 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO

2.8.1 Tiosulfato de prata

O íon prata é um eficiente inibidor do mecanismo de ação do etileno, agindo por meio de sua ligação reversível às proteínas que se ligam ao etileno (EBPs), os supostos receptores para o regulador do crescimento (ABELES *et al.*, 1992). Em função de sua baixa mobilidade nos tecidos vegetais, o íon prata tem sido aplicado na forma de tiosulfato de prata (STS), sua forma mais móvel (BIDDINGTON, 1992). A dissociação do complexo aniônico prata do STS provavelmente precede sua interferência nos sítios de ligação do etileno (VEEN e OVERBEEK, 1989).

2.8.2 1-Metilciclopropano (1-MCP)

Recentemente, moléculas orgânicas que bloqueiam os receptores do etileno por longos períodos têm sido descobertas. Algumas destas moléculas, a exemplo do 1-metilciclopropano (1-MCP), conferem insensibilidade dos tecidos ao etileno por 10-12 dias e atuam em concentrações tão baixas como $0,5 \text{ n l.l}^{-1}$. O 1-MCP, um gás não tóxico, atua ligando-se de forma irreversível às EBPs (SISLER *et al.*, 1996a; SISLER *et al.*, 1996b), conferindo aos tecidos insensibilidade ao etileno, insensibilidade esta que pode desaparecer quando a planta forma novos receptores. O 1-MCP provavelmente se liga a um metal nas EBPs, prevenindo competitivamente ligações posteriores do etileno às EBPs nos tecidos tratados com o gás. O 1-MCP se constitui em alternativa vantajosa ao uso dos íons prata, uma vez que o último, como um metal pesado, causa problemas ambientais (SEREK *et al.*, 1995).

2.9 BRASSINOESTERÓIDES

Os brassinoesteróides são fitoesteróides polioxigenados dotados de pronunciada atividade reguladora de crescimento vegetal (ZULLO, 1999).

Em 1979, o primeiro esteróide bioativo com alta atividade promotora de crescimento em plantas (MANDAVA e SASSE, 1981; MANDAVA, 1988; KAMURO e TAKATSUTO, 1999), o brassinolídio, foi isolado a partir do pólen de colza (*Brassica napus*) e teve sua estrutura elucidada (GROVE *et al.*, 1979). Desde o isolamento do brassinolídio, diversos brassinoesteróides foram isolados de diversos órgãos de plantas de diferentes famílias (ADAM e MARQUARDT, 1986; SINGH e BHARDWAJ, 1986; MANDAVA, 1988; ABREU, 1991; TAKATSUTO, 1994; FUJIOKA e SAKURAI, 1997).

Os brassinoesteróides estimulam o alongamento e a divisão celular, resultando em alongamento, intumescimento, curvatura e ramificação do internódio tratado, sendo estas alterações morfológicas dependentes da concentração da molécula utilizada (KAMURO e

TAKATSUTO, 1999). Os BRs, quando aplicados exogenamente em concentrações da ordem do nanomolar ao micromolar, têm apresentado efeito marcante na proliferação e alongamento celular (ADAM e MARQUARDT, 1986).

Embora os brassinoesteróides apresentem, aparentemente, atividade regulatória sobre o crescimento das plantas por si, estas moléculas têm-se mostrado capazes de estimular a biossíntese do etileno pelo aumento da atividade da ACC-sintase (ARTECA, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM E MULTIPLICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi obtido a partir de partes aéreas de um clone do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*), cultivado *in vitro*, fornecido pelo Dr. Enio Luiz Pedrotti, professor do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina.

As partes aéreas foram multiplicadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com (μM): 1,48 de tiamina; 26,64 de glicina; 2,43 de piridoxina; 4,06 de ácido nicotínico; 555 de mio-inositol e 2,22 de benzilaminopurina (BAP), além de 3% (m/v) de sacarose e 0,6 % (m/v) de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem (pressão de 1,5 atm e temperatura de 120° C, durante 20 minutos). Quarenta mililitros de meio de cultura foram adicionados a frascos de vidro com volume interno de 210 ml.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura do ar igual a $27 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) igual a $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo super luz do dia (General Electric- Universal -N-Duramax - 40 Watts). A umidade relativa do ar se manteve em $75 \pm 5\%$.

3.3 EXPERIMENTOS COM INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO

Segmentos nodais e ápices caulinares decapitados, medindo entre 15 e 20 milímetros de comprimento, obtidos a partir de partes aéreas multiplicadas de acordo com o

procedimento acima referido, foram empregados como fonte de explantes nos testes envolvendo inibidores da biossíntese do etileno. Os explantes foram inoculados no mesmo meio de cultura e condições empregadas para a multiplicação do material vegetal, exceto pela adição de três inibidores da biossíntese do etileno, como descrito em seguida.

Ao meio de cultura previamente autoclavado foram adicionados, respectivamente, a aminoetoxivinilglicina [L- α -(2-aminoetoxivinil)-glicina, AVG], na forma comercial A-Rest® (15% de princípio ativo, “Abbott Laboratories”, Long Grove, IL, USA) e ácido α -amino isobutírico (AIB) (Sigma St. Louis, MO, USA), após terem sido esterilizados por ultrafiltração através de filtros descartáveis, com diâmetro de poro igual a 0,22 μ m (Millipore, São Paulo, SP, Brasil). O dicloreto de cobalto [(CoCl₂.6H₂O), Vetec Química Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil] foi autoclavado juntamente com o meio de cultura.

O delineamento experimental empregado nos três experimentos foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos; cinco repetições por tratamento e cinco explantes por parcela. Os tratamentos utilizados nos experimentos foram:

- AVG (μ M): 0; 1,25; 2,5; 5 e 10;
- CoCl₂ (μ M): 0; 150; 300; 600 e 1200;
- AIB (μ M): 0; 0,5; 1; 2 e 4.

3.4 EXPERIMENTO COM INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO

O material vegetal, o meio de cultura e as condições de cultivo foram utilizados nestes experimentos como descrito no item 3.3.

3.4.1 Tiosulfato de prata (STS)

A solução estoque de STS (1mM) foi preparada a partir de soluções estoque de tiosulfato de sódio e nitrato de prata na razão molar de 1: 4. A solução de STS foi esterilizada por ultrafiltração, como descrito para os inibidores da biossíntese do etileno, e adi-

cionada ao meio de cultura previamente autoclavado. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (μM): 0; 6,25; 12,5; 25 e 50, cinco repetições por tratamento e cinco explantes por parcela.

3.4.2 1-Metilciclopropano (1-MCP)

Neste experimento foram utilizados frascos de vidro com volume interno de 600 ml, aos quais foram adicionados 50 ml do meio de cultura utilizado para a multiplicação das partes aéreas. Após a autoclavagem, os frascos contendo o meio de cultura foram hermeticamente fechados com tampas de alumínio munidas de um vedador de látex, através do qual foi injetado o gás 1-metilciclopropano (1-MCP), após sofrer processo de ultrafiltração, de maneira que a atmosfera interna dos frascos contivesse o gás nas concentrações finais de 100 ou 200 $\mu\text{l.l}^{-1}$.

Os frascos foram abertos a cada 10 dias, sendo mantidos abertos por um período de 5 minutos, em capela de fluxo laminar, após o qual foram novamente hermeticamente fechados. Em seguida, a atmosfera interna dos frascos foi novamente enriquecida com 1-MCP, como acima descrito. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos ($\mu\text{l.l}^{-1}$): 0; 100 e 200; quatro repetições por tratamento e sete explantes por parcela.

3.5 EXPERIMENTOS COM BRASSINOESTERÓIDES- BRs

Neste experimento foram testadas duas moléculas de brassinoesteróides do grupo das Castasteronas: 28-homoetilcastasterona (28-HCTS) e 28-homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS), fornecidas pela Dr^a. Lydia Galagovsky (Departamento de Química Orgânica, Universidade de Buenos Aires, Argentina) (Figuras 2 e 3).

Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura empregado para multiplicação das partes aéreas, onde foram cultivados durante duas semanas. Em seguida, uma

microgota (5µl) de solução etanólica, contendo 1 ou 10 µg dos brassinoesteróides, foi aplicada sobre a nervura central da folha, apresentando largura maior ou igual a 5 mm, mais próxima do ápice caulinar de cada parte aérea. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos em $[\mu\text{g} \cdot (\text{parte aérea})^{-1}]$: 0; 1 e 10; cinco repetições por tratamento e cinco explantes por parcela.

3.6 VARIÁVEIS AVALIADAS

Os experimentos foram avaliados 30 dias após o início do tratamento do material vegetal com os inibidores da biossíntese e /ou do mecanismo de ação do etileno e com brassinoesteróides. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) Número de ramos principais (ramos originados diretamente a partir do explante original, especificados em ramos medindo menos que 1,5 cm e ramos medindo 1,5 cm ou mais de comprimento) e número de ramos laterais primários (ramos originados diretamente a partir dos ramos principais, especificados em ramos medindo menos que 1,5 cm e ramos medindo 1,5 cm ou mais de comprimento).
- b) Comprimento dos ramos principais e laterais primários;
- c) Taxa de multiplicação (número de segmentos nodais e ápices caulinares, aptos à multiplicação *in vitro*, formados após o subcultivo, discriminados de acordo com sua localização nos ramos principais ou laterais).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos experimentos foi feita por meio do Programa de Análise Estatística “MSTATC” (“Department of Crop and Soil of Michigan State University”). Após a análise de variância, a diferença entre as médias por tratamento foi analisada pelo teste de Tukey. Todos os dados obtidos nos experimentos foram empregados nas análises. Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

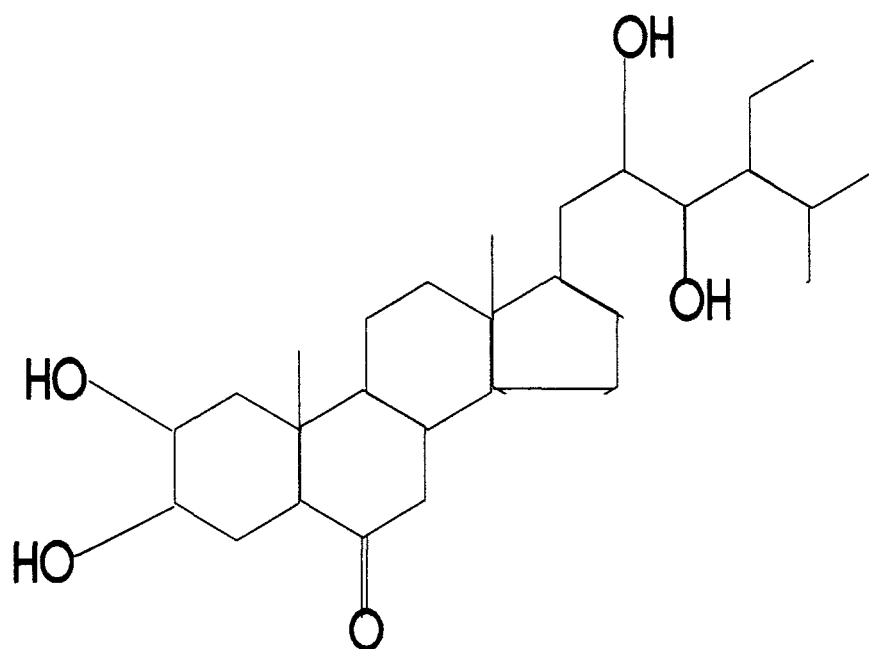


FIGURA 2. ESTRUTURA MOLECULAR DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS)

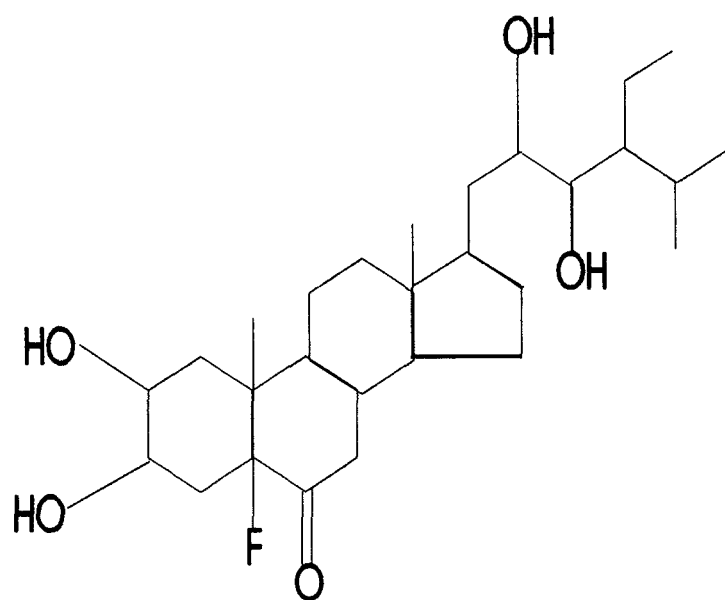


FIGURA 3. ESTRUTURA MOLECULAR DA 28-HOMOETIL-5-FLUÓR-CASTASTERONA (5F-HCTS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPRIMENTO DO RAMO PRINCIPAL E LATERAL PRIMÁRIO

4.1.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO

4.1.1.1 L- α -(2-aminoetoxivinil)-glicina (AVG)

Verificou-se uma redução significativa ($p=0,05$) no comprimento médio dos ramos principais associada à presença da AVG no meio de cultura, em todas as concentrações testadas, exceto para a concentração de 1,25 μM . Quanto ao comprimento médio dos ramos laterais primários, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4).

A AVG inibe enzimas dependentes de piridoxal fosfato, grupo de enzimas das quais a ACC sintase faz parte (YANG e HOFFMAN, 1984). Assim, a AVG inibe a conversão da SAM para ACC (BOLLER *et al.*, 1979).

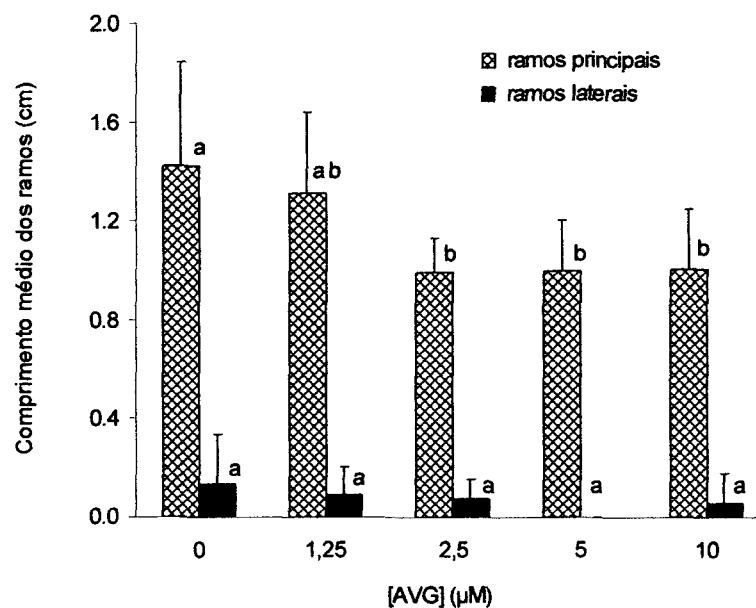


FIGURA 4 - EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

Os resultados obtidos neste trabalho contrariam experimentos anteriores, nos quais estimulação de alongamento de ramos laterais mostrou-se associada a tratamentos com AVG, a exemplo de árvores de macieira de um ano de idade, crescidas a campo (CURRY e WILLIAMS, 1986). Entretanto, em experimentos realizados com *Phaseolus vulgaris* L., a AVG não apresentou efeito significativo sobre o crescimento de gemas axilares e partes aéreas, embora o composto tenha reduzido a liberação e o teor endógeno de etileno aproximadamente na mesma proporção (YOUNG e HILLMAN, 1981).

Em experimentos com macieira (*Malus domestica*) crescendo *in vitro*, tratamento com dose de 12,5 μM de AVG reduziu o crescimento de gemas axilares e causou deformações em partes aéreas, a exemplo do encrespamento das folhas (LAMBARDI *et al.*, 1997).

Em *Vigna radiata*, 100 μM de AVG reduziu a formação do etileno em mais de 50 % (WENZEL *et al.*, 1995). Em ápices de raiz de milho (*Zea mays* L.), após o tratamento com 1 μM de AVG, foi observada uma redução de 65 % na formação de etileno (MULKEY *et al.*, 1982).

4.1.1.2 Dicloreto de cobalto- CoCl_2

Pelos resultados obtidos, observou-se que houve redução significativa ($p=0,05$) do comprimento médio dos ramos principais, associada à presença do dicloreto de cobalto no meio de cultura, em todas as concentrações testadas. À medida que foi aumentada a concentração do dicloreto de cobalto no meio de cultura, houve significativa redução, proporcional ao aumento da concentração, no comprimento médio dos ramos em relação ao controle.

As concentrações de CoCl_2 , acima de 300 μM , provocaram sintomas de queima nos explantes, assim como folhas enroladas e cloróticas, além de terem inibido a formação de ramos laterais, sendo, portanto, evidentes os sintomas de fitotoxicidade causada pelo dicloreto de cobalto. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$) quan-

to ao comprimento médio dos ramos laterais primários, entre as partes aéreas do controle e os tratamentos com dicloreto de cobalto (Figura 5).

Os resultados obtidos neste experimento contrariam dados publicados anteriormente por MILLER (1951) e THIMANN (1956). De acordo com aqueles autores, o Co^{++} é conhecido por promover expansão foliar e alongamento do caule em vários tecidos.

A inibição da biossíntese do etileno pelo íon cobalto se dá devido à prevenção da conversão da SAM para ACC e pela inibição da conversão do ACC para etileno, através da inibição da ACC-oxidase (BIDDINGTON, 1992; VIOQUE e CASTELLANO, 1994; WENZEL *et al.*, 1995). Em cotilédones de cardo (*Sylibum marianum*), a aplicação de 200 μM de dicloreto de cobalto inibiu a produção de etileno em 80 % (SATO e ESASHI, 1983).

As razões pelas quais os íons cobalto não foram capazes de estimular a proliferação de brotações laterais no porta-enxerto de macieira utilizado neste trabalho não são

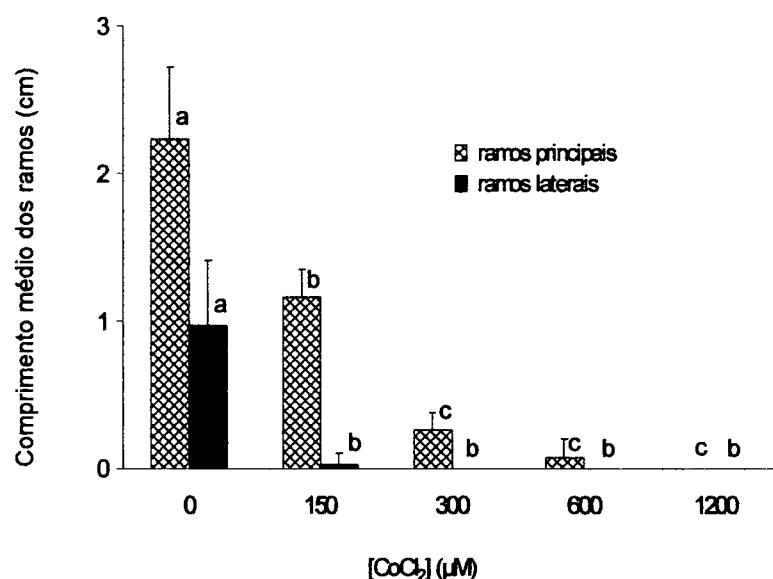


FIGURA 5. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

claras; todavia, uma possível justificativa para os resultados encontrados é a eventual incapacidade dos íons cobalto de inibirem, significativamente, a produção de etileno no sistema testado.

4.1.1.3 Ácido α -aminoisobutírico (AIB)

Nenhuma alteração significativa ($p=0,05$), no comprimento médio dos ramos principais ou no comprimento médio dos ramos laterais, mostrou-se associada a quaisquer das concentrações de ácido α -aminoisobutírico (AIB) testadas (Figura 6).

Diversos trabalhos têm sido feitos para se determinar o efeito de estruturas análogas ao ACC na produção de etileno, incluindo ácidos orgânicos de cadeia curta (SATO e ESASHI, 1980; APELBAUM *et al.*, 1981; SATO e ESASHI, 1982). O ácido α -aminoisobutírico inibe significativamente e competitivamente a produção de etileno, embora esta inibição não seja tão eficiente como no caso de outros inibidores, a exemplo da aminoetoxivinilglicina. Em cotilédone de cardo (*Sylibum marianum*), a produção de

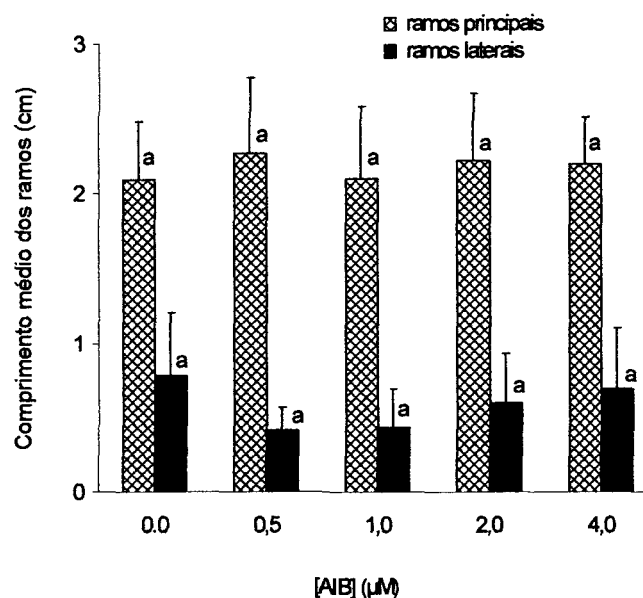


FIGURA 6. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

etileno foi inibida em 80 % por uma dose de 10 mM de ácido α -aminoisobutírico (SATO e ESASHI, 1983).

GASPAR *et al.* (1989), em experimento realizado com a utilização de partes aéreas decapitadas de *Rosa hybrida*, constatou que o AIB não inibiu efetivamente a liberação do etileno quando usado em baixas concentrações (2,5 mM) e se tornou tóxico quando usado em altas concentrações (100 mM).

A baixa eficiência com a qual o AIB inibe a biossíntese do etileno poderia explicar a ausência de efeito observável do composto sobre os parâmetros avaliados, todavia, neste trabalho, não foi avaliado o efeito do AIB sobre a liberação do etileno pelo tecido vegetal.

4.1.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO

4.1.2.1. Efeito do tiosulfato de prata (STS)

Verificou-se redução no comprimento médio dos ramos principais, associada à presença de STS no meio de cultura, em todas as concentrações testadas (Figura 7). No entanto, a redução do alongamento dos ramos principais só foi estatisticamente significativa ($p=0,05$) para as concentrações de 25 e 50 μ M. Quanto ao comprimento médio dos ramos laterais primários, não houve diferença estatística entre as concentrações testadas (Figura 7). Em diversas espécies, a exemplo de *Pisum sativum*, o desenvolvimento de gemas laterais é inibido pelo etileno (YEANG e HILLMAN, 1984).

O tiosulfato de prata (STS), uma forma mais móvel do íon prata, tem seu mecanismo de ação baseado na ligação dos íons prata às proteínas que se ligam ao etileno (EBPs), os presumíveis receptores para o etileno (SISLER, 1991).

O íon prata, na forma de nitrato (AgNO_3), testado em mimosa (*Albizzia julibrissin*), promoveu aumento na percentagem de partes aéreas formadas e também aumentou o número de partes aéreas formadas por explante cultivado (SANKHLA *et al.*, 1995).

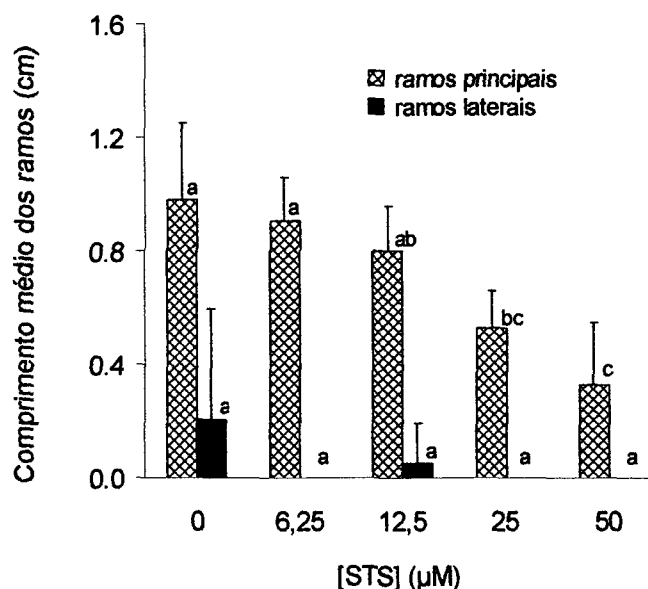


FIGURA 7. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

Em tulipa, o alongamento do caule é inibido pelo etileno, podendo o efeito ser prevenido por tratamentos com íons prata (NICHOLS e KOFRANEK, 1982).

4.1.2.2 1-Metilciclopropano (1-MCP)

A Figura 8 apresenta o efeito do 1-MCP sobre o comprimento médio dos ramos principais e laterais primários. Redução significativa ($p=0,05$) no comprimento médio, tanto dos ramos principais quanto dos ramos laterais, mostrou-se associada à presença do 1-MCP na atmosfera interna dos frascos de cultura nas duas concentrações testadas neste experimento, sendo que a maior redução foi encontrada para explantes crescidos na presença de 1-MCP na concentração de $200 \mu\text{l.l}^{-1}$.

Resultados obtidos em experimentos com cravos de corte sugerem que o 1-MCP atua como um potente inibidor da resposta do etileno, sendo seu mecanismo de ação baseado na ligação prolongada da molécula às EBPs (SISLER *et al.*, 1996a). Todavia, a inibição do mecanismo de ação do etileno, causada pelo bloqueio das EBPs pode ser

superada pela síntese “de novo” de EBPs (SISLER *et al.*, 1996a, 1996b; GOLDING *et al.*, 1998).

Em plantas como alstroemeria, begônia, cravo, rosa, *Mathiola*, *Phalaenopsis* e *Phlox*, o pré-tratamento com 1-MCP, em concentrações da ordem de nanolitro por litro, tem-se mostrado capaz de inibir a abscisão ou murchamento induzido pelo etileno (PORAT *et al.*, 1995a, 1995b; SEREK *et al.*, 1994a, 1994b). Para bananas, o tratamento com 0,7 nl.l^{-1} de 1-MCP por 24 horas é suficiente para protegê-las contra a degradação da clorofila nos frutos estimulada pelo etileno. Todavia, níveis de 0,4 nl.l^{-1} ou menores não são suficientes para proteger os frutos contra os efeitos do etileno. Para tomates (*Lycopersicon esculentum*) verdes, concentrações de 1-MCP mais elevadas (5 nl.l^{-1}) oferecem algum grau de proteção, todavia, tratamento com concentração de 7 nl.l^{-1} por 24 horas é necessário para completa proteção do fruto contra o etileno (SISLER e SEREK, 1997).

NAKATSUKA *et al.* (1997) demonstraram que a aplicação de 1-MCP inibiu a síntese de ACC-sintase (ACS) e ACC-oxidase (ACO), enzimas-chave no processo de biossíntese do etileno, durante o amadurecimento de frutos de tomate. Assim, o 1-MCP, além de inibir o mecanismo de ação do etileno, pela sua ligação com as EBPs, também

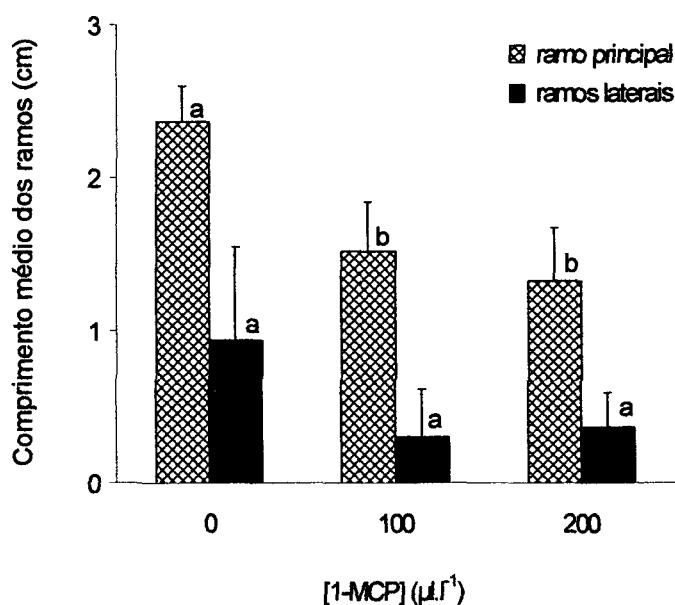


FIGURA 8. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

parece ser capaz de inibir a síntese endógena do etileno, intensificando, portanto, seu efeito inibitório sobre os efeitos fisiológicos do regulador do crescimento.

Os resultados dos experimentos onde foram usados o STS e o 1-MCP indicam que, no porta-enxerto de macieira Marubakaido, uma potencial inibição do mecanismo de ação do etileno não é capaz de estimular a proliferação de brotações laterais.

4.1.3 BRASSINOESTERÓIDES

4.1.3.1 28-homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS)

Verificou-se aumento da ordem de 8 e 6 % para o comprimento médio do ramo principal associado às doses de 1 e 10 µg de brassinoesteróide/ parte aérea, respectivamente. Todavia, a diferença observada entre os tratamentos não se mostrou significativa em nível de 5 % de probabilidade, de acordo com o teste de Tukey.

Aumento de 48 % no comprimento médio dos ramos laterais primários foi observado para partes aéreas tratadas com 1 µg de 5F-HCTS (1,15 cm), quando comparado ao controle (0,78 cm) (Figura 9). Todavia, este aumento não foi estatisticamente significativo em nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados obtidos neste experimento se assemelham aos resultados obtidos por YOPP *et al.* (1979) e WANG *et al.* (1993), nos quais brassinolídios (brassinoesteróides de ocorrência natural) promoveram o alongamento do mesocótilo de milho, epicótilo de feijão azuki, hipocótilo de girassol e de hipocótilo de repolho Pakchoi (*Brassica chinensis*).

4.1.3.2 28-homoetilcastasterona (28-HCTS)

De maneira similar ao que foi encontrado para o brassinoesteróide 5F-HCTS, nenhuma alteração estatisticamente significativa ($p=0,05$) foi encontrada para o comprimento de ramos principais de partes aéreas tratadas com 1 ou 10 µg de 28-

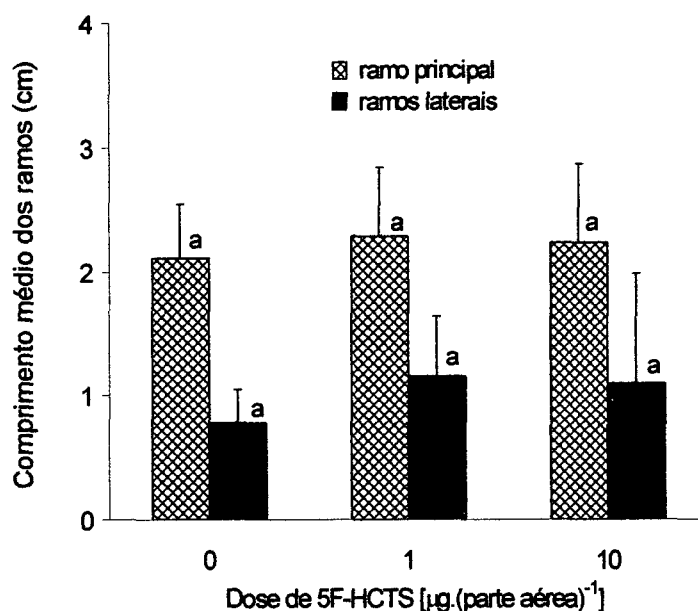


FIGURA 9. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

homoetilcastasterona (28-HCTS) por parte aérea.

Foi observada uma redução no comprimento médio dos ramos laterais associada ao tratamento com 28-HCTS, aplicado sobre a nervura central da folha mais próxima ao ápice do explante, em todas as doses testadas. Todavia, este efeito foi estatisticamente significativo somente para a dose de 1 μg do brassinoesteróide por parte aérea (Figura 10).

Os brassinoesteróides atuam sinergisticamente com diversas auxinas na produção de etileno (ARTECA *et al.*, 1983). Em plantas de tomate crescidas em solução hidropônica, demonstrou-se que houve incremento na curvatura do pecíolo e na produção de etileno e ACC, quando as plantas foram tratadas com 0,5 e 1 μM do brassinoesteróide brassinolídio (SCHLAGNHAUFER e ARTECA, 1985; ARTECA, 1990). Em trabalhos realizados por ARTECA e BACHMAN (1984) e por SCHLAGNHAUFER e ARTECA (1985) demonstrou-se que, em hipocótilos de feijão mungo, a produção de etileno é estimulada pelo brassinoesteróide 2α , 3α , 22β , 23β -tetrahidroxi- 24β -metil- β -homo-7-oxa- 5α -colestano-6-ona, sendo o aumento na produ-

ção de etileno associado ao aumento no nível de ACC-sintase. Este efeito estimulatório do brassinoesteróide na síntese do etileno é similar ao efeito induzido pelas auxinas, uma vez que estas estimulam a síntese do etileno através da estimulação da síntese da ACC-sintase ou da atividade da mesma, resultando em maior produção de ACC, o precursor imediato do etileno (YU e YANG, 1979; SCHLAGNHAUFER e ARTECA, 1985). Assim, uma eventual estimulação da biossíntese do etileno, induzida pelo 28-HCTS, poderia ser responsável pela inibição do alongamento dos ramos laterais observado para partes aéreas tratadas com o brassinoesteróide.

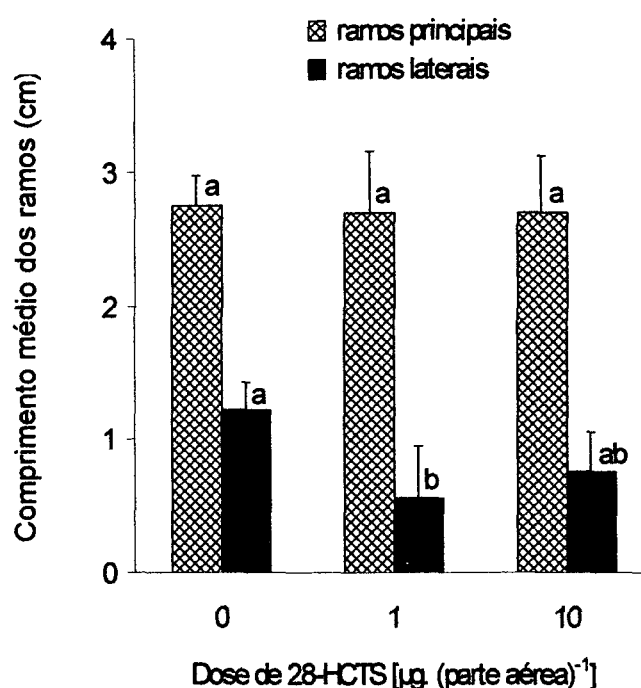


FIGURA 10. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O ALONGAMENTO DE RAMOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

4.2 NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS

4.2.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO

4.2.1.1 L- α -(2-Aminoetoxivinil)-glicina (AVG)

Foi observada redução no número médio de ramos principais $\geq 1,5$ cm para partes aéreas crescidas em meio de cultura com concentrações de L- α -(2-Aminoetoxivinil)-glicina (AVG) iguais ou superiores a $2,5 \mu\text{M}$, embora esta redução não tenha sido significativa ($p=0,05$). Ao contrário do que foi observado para o número de ramos principais $\geq 1,5$ cm, aumento no número de ramos principais $< 1,5$ cm foi observado para partes aéreas crescidas em meio de cultura contendo AVG, em todas as concentrações testadas, sendo este aumento da ordem de 74 % para a concentração de AVG igual a $5 \mu\text{M}$, embora não tenha sido estatisticamente significativo ($p=0,05$) (Figura 11).

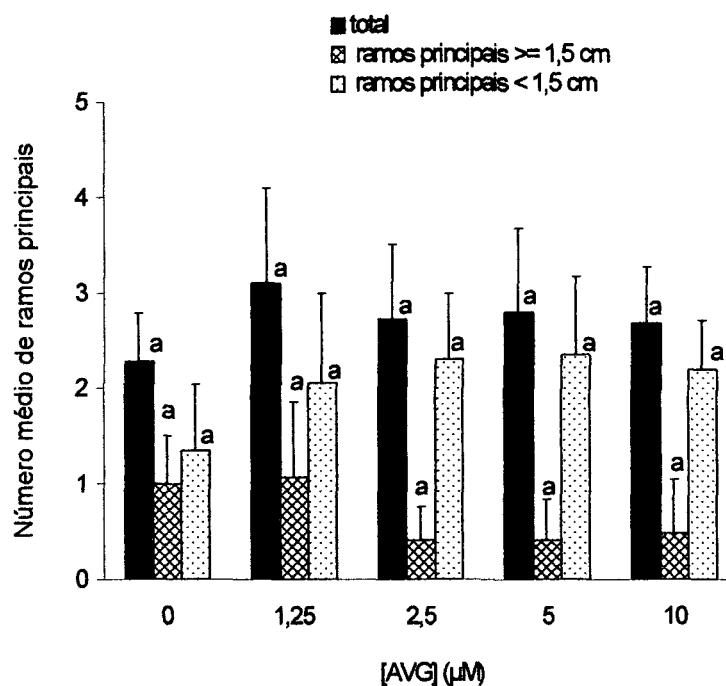


FIGURA 11. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

Para o número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm, os resultados mostraram que todos os tratamentos com AVG reduziram a zero o número médio de ramos, quando comparados ao controle. Quanto ao número médio de ramos laterais $< 1,5$ cm, o controle, com 0,33 ramos em média, apresentou resultado significativamente superior aos demais tratamentos ($p=0,05$) (Figura 12).

Em experimentos realizados por CURRY e WILLIAMS (1986), demonstrou-se que a AVG induz ramificação em partes aéreas de várias espécies, incluindo culturas crescidas a campo, a exemplo da macieira (*Malus domestica* Borkh). Já em experimentos feitos por GONZÁLEZ *et al.* (1997), o tratamento de *Populus tremula* L. com AVG resultou em redução no comprimento dos ramos.

Em *Annona squamosa*, estímulo para o desenvolvimento de gemas geradas a partir de meristemas pré-formados na axila das folhas em explantes nodais mostrou-se

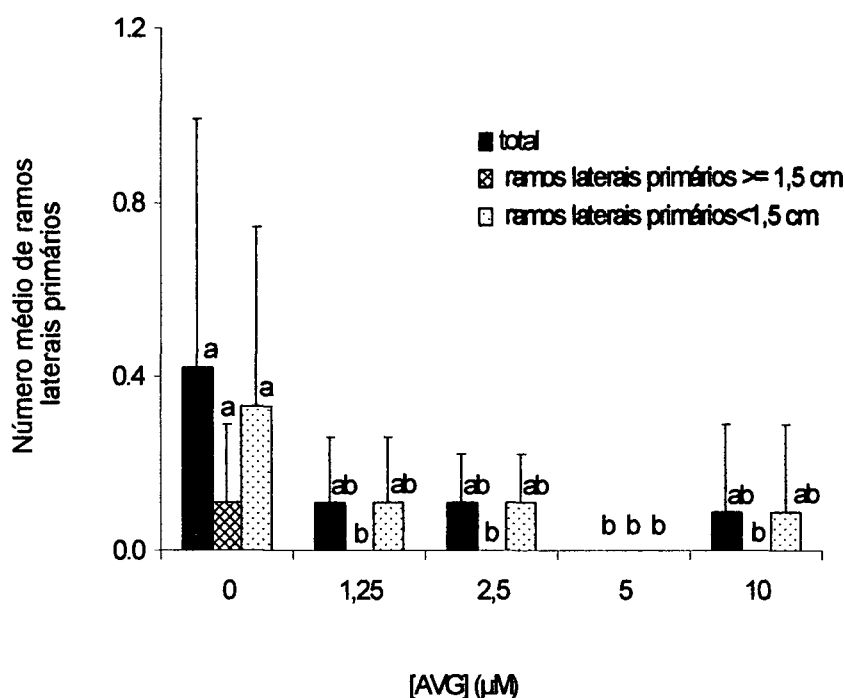


FIGURA 12. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

relacionado à inibição da ACC-sintase induzida pela AVG (LEMOS e BLAKE, 1996).

Os resultados obtidos neste experimento indicam que a AVG, por meio de uma possível inibição da biossíntese do etileno, estimula a proliferação ramos laterais <1,5 cm, além de inibir o alongamento posterior dos ramos laterais iniciados.

4.2.1.2 Dicloreto de cobalto (CoCl_2)

Foi encontrada uma redução progressiva estatisticamente significativa ($p=0,05$) do número médio de ramos principais $\geq 1,5$ cm, associada à concentrações crescentes de dicloreto de cobalto no meio de cultura (Figura 13).

Já nos resultados obtidos quanto ao número médio de ramos principais < 1,5 cm, houve um aumento significativo ($p=0,05$) no número deste tipo de ramo, quando o íon cobalto estava presente no meio de cultura na concentração de 150 μM de CoCl_2 . Para concentrações acima de 150 μM , observou-se redução no número médio de ramos

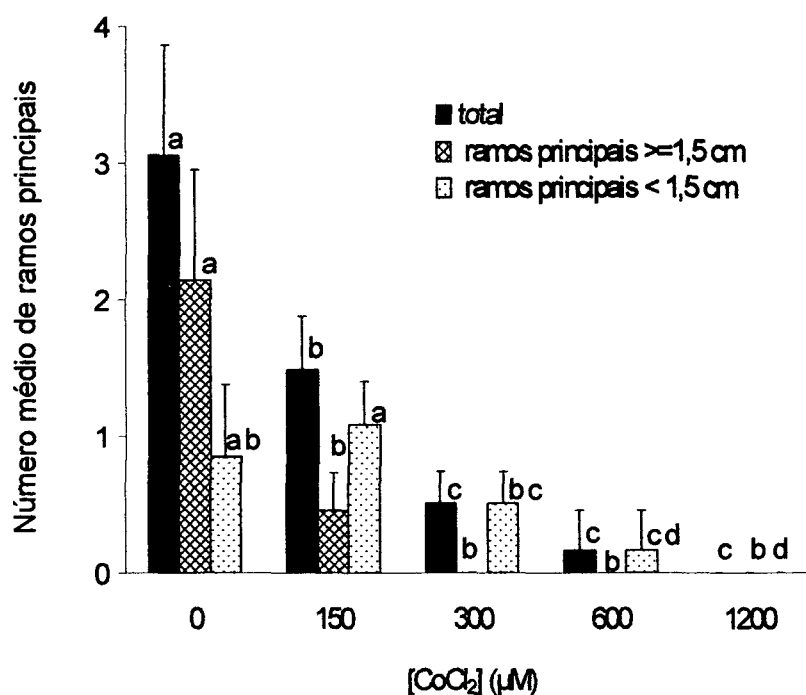


FIGURA 13. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAI-DO CRESCIDAS *IN VITRO*.

principais < 1,5 cm, quando comparado ao controle (Figura 13).

Quanto ao número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm e < 1,5 cm, a presença do dicloreto de cobalto no meio de cultura, em todas as concentrações testadas, inibiu totalmente ($p=0,05$) a formação dos mesmos (Figura 14). Os explantes crescidos em meio de cultura contendo CoCl_2 , em concentrações iguais ou maiores que 150 μM , apresentaram ainda folhas cloróticas, enroladas e com sintoma de queima, indicando uma provável fitotoxicidade causada pelo íon.

Estes dados se assemelham aos resultados obtidos para partes aéreas de *H. speciosa*, nos quais o íon cobalto não se mostrou capaz de estimular a proliferação de brotações laterais (PEREIRA-NETTO e McCOWN, 1999).

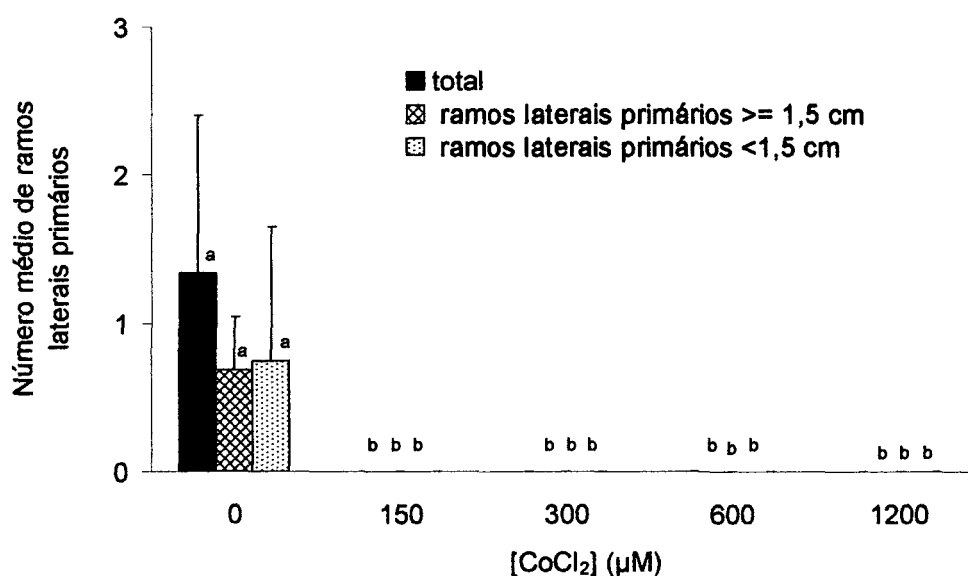


FIGURA 14. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

4.2.1.3 Ácido α -aminoisobutírico (AIB)

A presença do ácido α -aminoisobutírico (AIB) no meio de cultura não induziu tendência à elevação ou redução no número de ramos principais $\geq 1,5$ cm ou $< 1,5$ cm (Figura 15). De maneira similar ao que foi observado para o número de ramos principais, nenhuma tendência para aumento ou diminuição do número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm ou $< 1,5$ cm foi observada para partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido, crescidas em meio de cultura contendo AIB em concentrações variando de 0,5 a 4 μ M. (Figura 16).

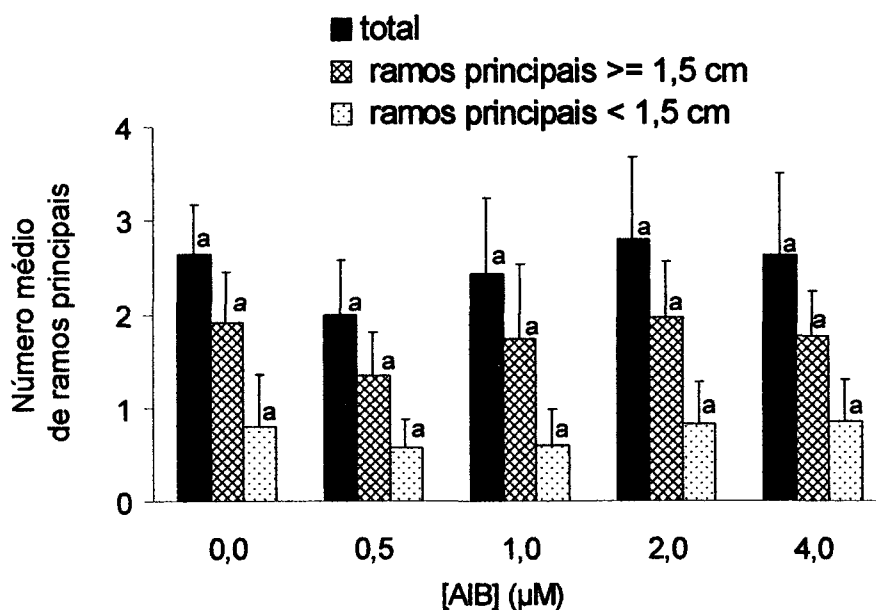


FIGURA 15. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

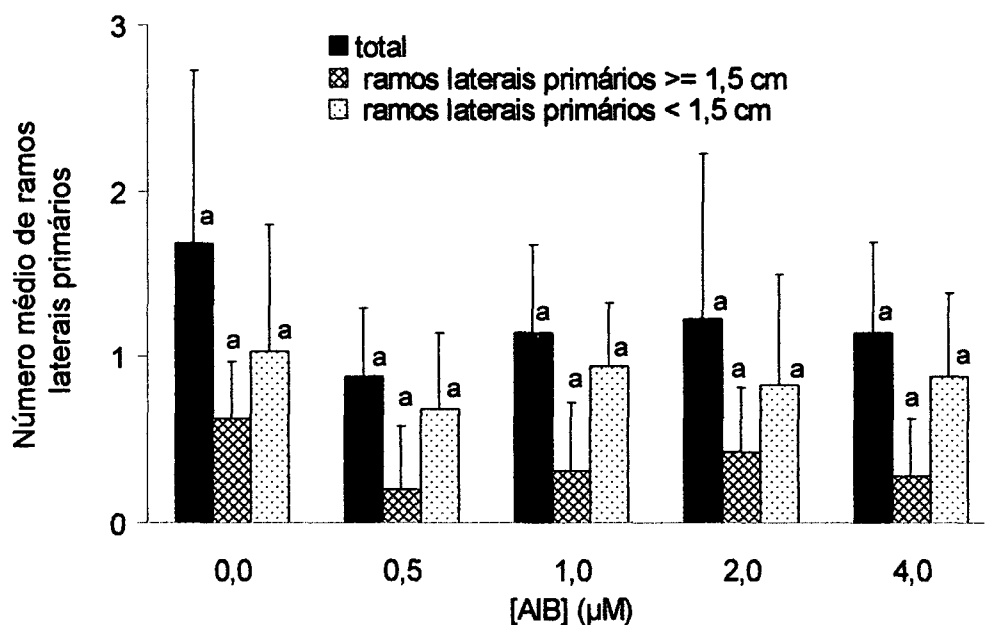


FIGURA 16. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

4.2.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO

4.2.2.1 Tiosulfato de prata (STS)

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que houve redução significativa ($p=0,05$) no número médio de ramos principais $\geq 1,5$ cm e $< 1,5$ cm, para todas as concentrações de tiosulfato de prata (STS) testadas, sendo esta redução diretamente proporcional à concentração de STS no meio de cultura.

Os resultados obtidos mostraram que, para todas as concentrações de STS presentes no meio de cultura, não houve diferença significativa ($p=0,05$) quanto ao número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm e número médio de ramos laterais primários $< 1,5$ cm, formados durante o ciclo de cultivo (Figura 18).

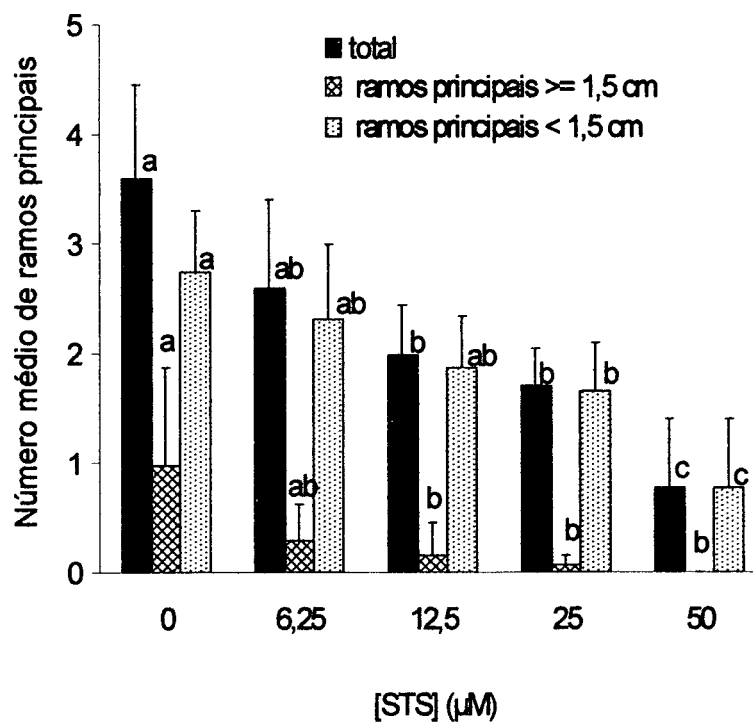


FIGURA 17. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

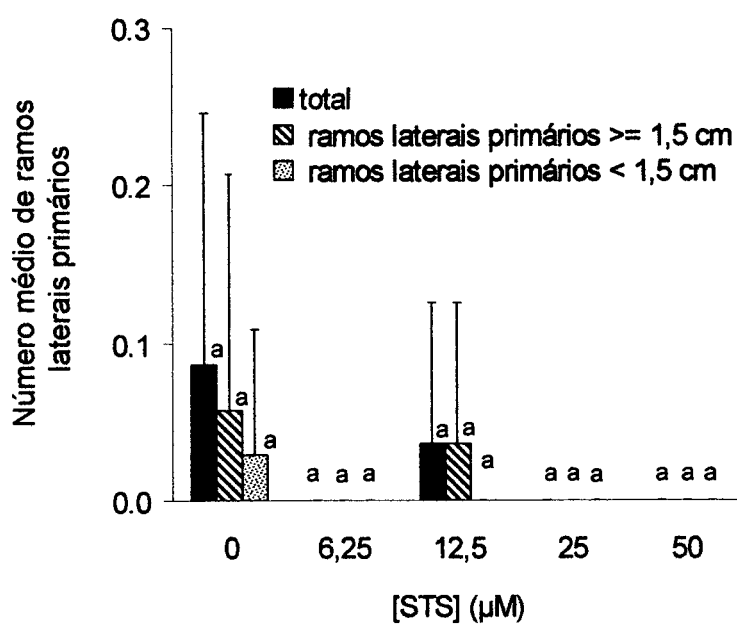


FIGURA 18. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

Os resultados obtidos neste experimento divergem dos resultados obtidos por PEREIRA-NETTO e McCOWN (1999) para *H. speciosa*, onde 5 μM de STS induziu aumento significativo no número médio de ramos laterais em plantas crescidas a 31° C. Segundo YEANG e HILLMAN (1981), a aplicação do íon prata (Ag^+) no ápice de partes aéreas não estimula o crescimento de gemas laterais em plantas de *Phaseolus*.

4.2.2.2 1-Metilciclopropano (1-MCP)

Redução no número médio de ramos principais $\geq 1,5$ cm foi observada para todos os tratamentos onde foi empregado o 1-MCP, sendo que diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$) foi observada somente para o tratamento com 200 $\mu\text{l.l}^{-1}$ (Figura 19). O número médio de ramos principais $< 1,5$ cm, ao contrário do que foi observado para o número médio de ramos principais $\geq 1,5$ cm, teve aumento em relação ao controle nos dois tratamentos com 1-MCP (100 e 200 $\mu\text{l.l}^{-1}$), sendo que este aumento foi significativo ($p=0,05$) somente para o tratamento com a dose de 200 $\mu\text{l.l}^{-1}$.

Tanto o número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm quanto o número médio de ramos laterais primários $< 1,5$ cm foi reduzido em ambas as doses de 1-MCP testadas (Figura 20), sendo a redução observada estatisticamente significativa em nível de 5% de probabilidade somente para o número médio de ramos $\geq 1,5$ cm.

Os resultados obtidos neste experimento se assemelham aos resultados obtidos por PEREIRA-NETTO e McCOWN (1999) para *H. speciosa*, onde uma dose de 90 nl.l^{-1} de 1-MCP aumentou seis vezes o número médio de ramos laterais >10 mm.

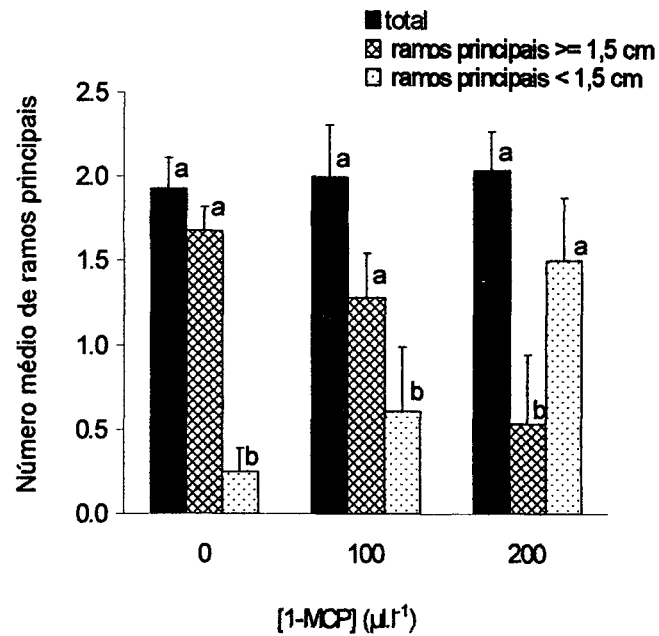


FIGURA 19. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

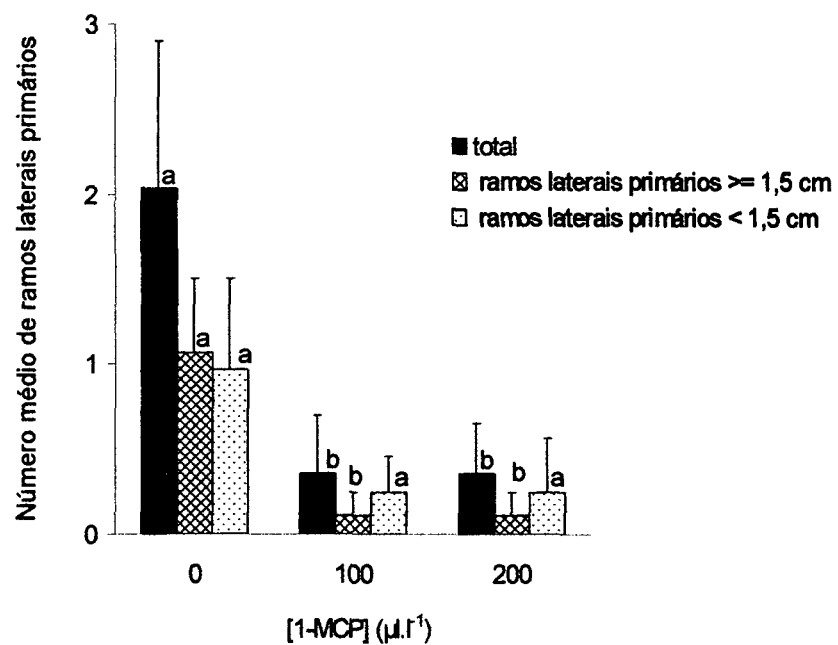


FIGURA 20. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

4.2.3 BRASSINOESTERÓIDES

4.2.3.1 28-homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS)

O número médio total (sem discriminação) de ramos principais aumentou de maneira proporcional ao aumento da dose do 5F-HCTS, sendo esse aumento de 33 % para a dose 1 μg e de 61 % para a dose de 10 μg de 5F-HCTS por parte aérea, quando comparado ao controle, sendo o aumento de 61 % significativo em nível de 5% probabilidade. Aumento no número de ramos principais $\geq 1,5$ cm foi da ordem de 66 % para a dose de 1 μg e de 71 % para a dose de 10 μg de 5F-HCTS por parte aérea, comparados ao controle. Estes resultados demonstram o efeito estimulador do brassinoesteróide fluoretado sobre a emissão de ramos primários úteis para a micropropagação (Figura 21). Nenhuma tendência para alteração no número médio de ramos principais $< 1,5$ cm foi observada para partes aéreas tratadas com o brassinoesteróide fluoretado.

Quanto ao número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm, foi observado aumento no número deste tipo de ramo, tendo sido o efeito semelhante para ambas as doses do brassinoesteróide utilizadas. No entanto, a estimulação no aumento do número de ramos induzida pelo tratamento com o 5F-HCTS não foi estatisticamente significativa ($p=0,05$).

Para o número médio de ramos laterais $< 1,5$ cm, houve redução no número de ramos nas partes aéreas tratadas com o brassinoesteróide fluoretado, sendo que, para a dose de 10 μg de 5F-HCTS por parte aérea, foi observada uma formação média de 0,37 novos ramos por parte aérea, enquanto que para o controle esta média foi igual a 0,80, o que representa uma redução da ordem de 46 % no número de ramos. Embora essa redução tenha sido expressiva, a mesma não foi significativa em nível de 5 % de probabilidade (Figura 22).

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que, a forma fluoretada do brassinoesteróide HCTS estimulou efetivamente a produção de ramos principais no

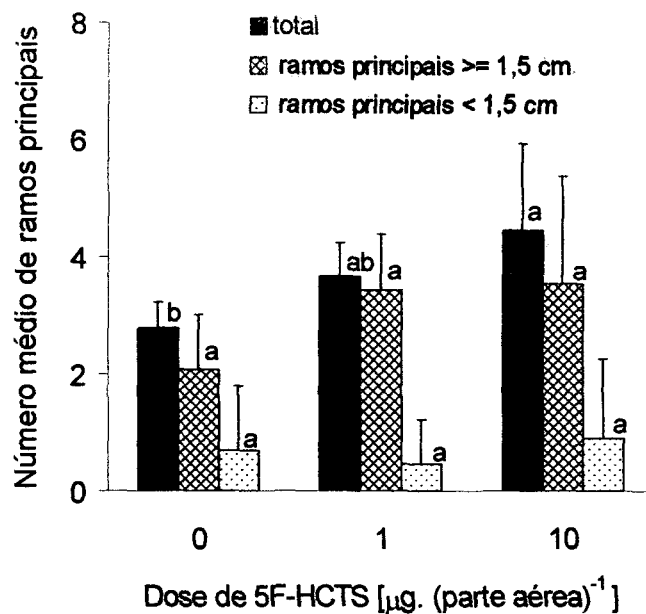


FIGURA 21. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

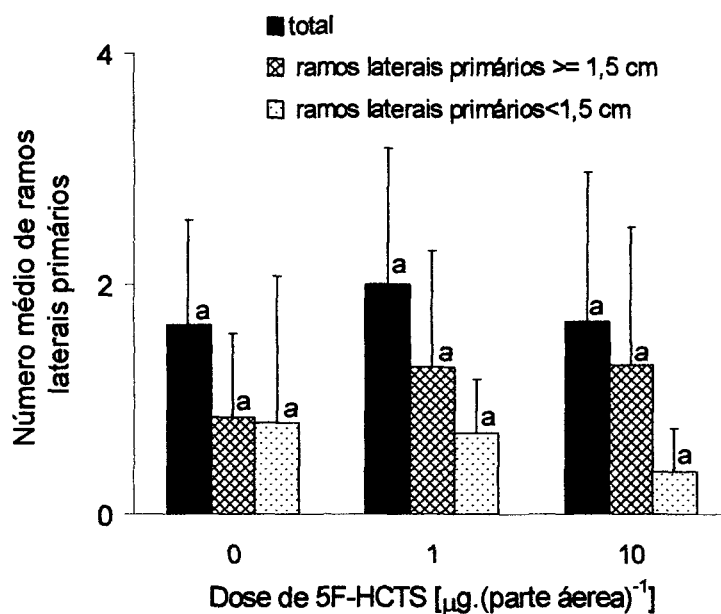


FIGURA 22. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

porta-enxerto de macieira Marubakaido $\geq 1,5$ cm (ramos mais utilizados para fins de micropropagação).

4.2.3.2 28-homoetilcastasterona (28-HCTS)

Ao contrário do que foi observado para a forma fluoretada do 28-homoetilcastasterona, o tratamento de partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido com a forma não fluoretada do brassinoesteróide inibiu de maneira não acentuada, e diretamente proporcional à dose, a formação de ramos principais $\geq 1,5$ cm e também $< 1,5$ cm, não sendo, contudo, a diferença entre as médias significativa em nível de 5 % de probabilidade (Figura 23).

Embora também não tenha sido estatisticamente significativa em nível de 5% de probabilidade, observou-se redução progressiva no número médio de ramos laterais primários $\geq 1,5$ cm, de acordo com o aumento da dose do regulador de crescimento. Para o número médio de ramos laterais primários $< 1,5$ cm, também foi observada redução na formação de ramos tratados com 28-HCTS, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa em nível de 5% de probabilidade (Figura 24).

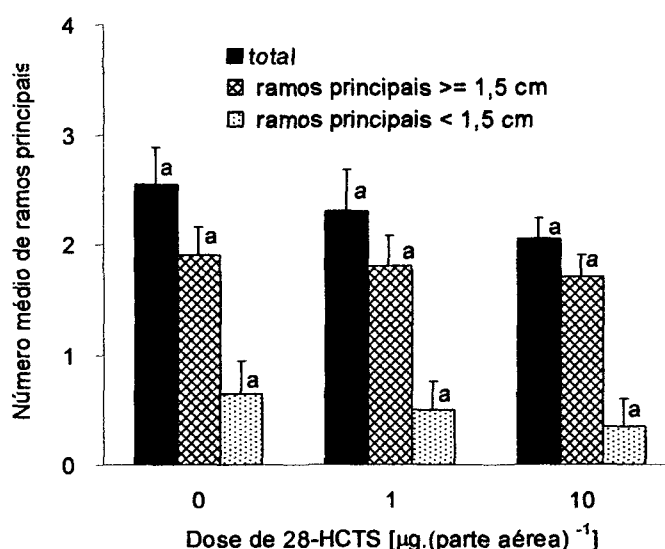


FIGURA 23. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS PRINCIPAIS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

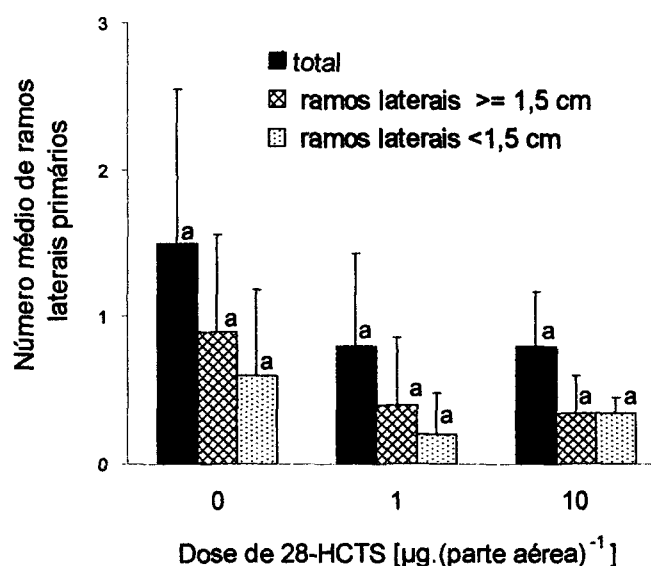


FIGURA 24. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE O NÚMERO MÉDIO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS, EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKIHO, CRESCIDAS *IN VITRO*.

4.3 TAXA DE MULTIPLICAÇÃO

4.3.1 INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DO ETILENO

4.3.1.1 L-α-(2-aminoetoxivinil)-glicina (AVG)

A TM associada aos ramos principais foi reduzida em todas as concentrações de aminoetoxivinilglicina (AVG) testadas, exceto pela concentração de 1,25 µM (Figura 25). No entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada em nível de 5 % de probabilidade para a redução na TM induzida pela AVG, em qualquer das concentrações do inibidor da biossíntese do etileno testadas.

Redução na TM associada aos ramos laterais primários foi observada para todas

as concentrações de AVG testadas (Figura 25), embora, de maneira semelhante ao que foi encontrado para a TM associada aos ramos principais, as diferenças entre os diversos tratamentos e o controle não tenham sido estatisticamente significantes em nível de 5 % de probabilidade.

O tratamento de partes aéreas de diferentes variedades de macieira crescidas a campo, com 500 ppm de AVG, provocou aumento no número de partes aéreas formadas para a cultivar de *Spencer*, não tendo ocorrido o mesmo para as cultivares *McIntosh* e *Spartan* (GREENE, 1983).

Assim, a estimulação da proliferação de ramos em macieira, induzida por AVG, parece ser dependente da cultivar considerada.

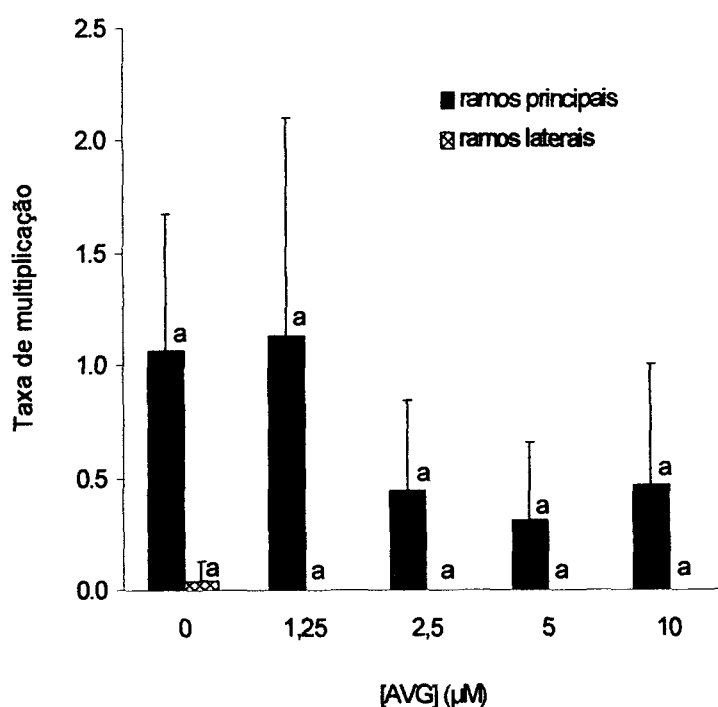


FIGURA 25. EFEITO DA AMINOETOXIVINILGLICINA (AVG) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.1.2 Dicloreto de cobalto (CoCl_2)

Os resultados obtidos mostraram redução na taxa de multiplicação (TM) associada aos ramos principais e laterais primários, para explantes crescidos na presença do dicloreto de cobalto (CoCl_2) no meio de cultura, tendo sido esta redução significativa ($p=0,05$) e inversamente proporcional ao aumento da concentração de CoCl_2 no meio de cultura (Figura 26).

Os resultados obtidos neste experimento são similares aos resultados obtidos para *H. speciosa* (mangabeira), onde o alongamento do ramo principal sofreu significativa inibição, sem que esta fosse acompanhada de proliferação de ramificações laterais (PEREIRA-NETTO, 1996).

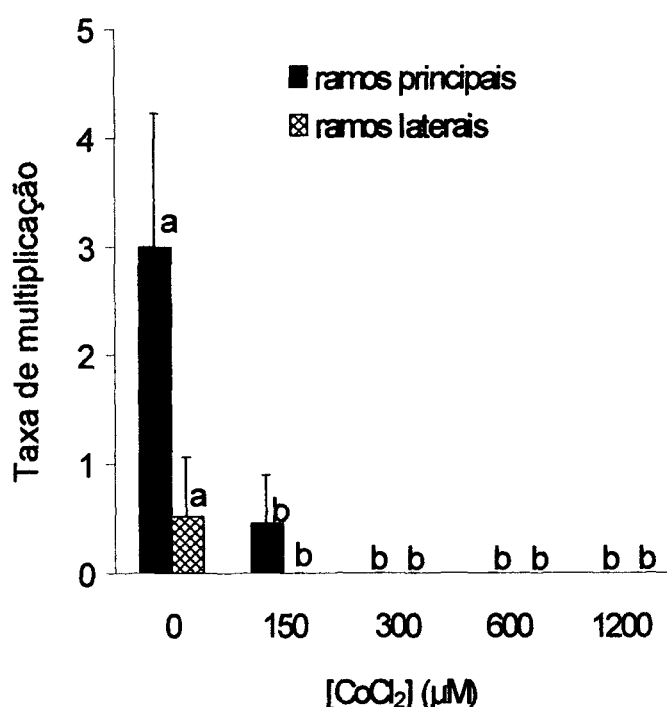


FIGURA 26. EFEITO DO DICLORETO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.1.3 Ácido α -aminoisobutírico (AIB)

Nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$) foi encontrada para TM associada aos ramos principais ou aos ramos laterais primários, formados a partir de partes aéreas crescidas na presença de ácido α -aminoisobutírico (AIB) no meio de cultura, em quaisquer das concentrações testadas (Figura 27).

A ausência de efeito do ácido α -aminoisobutírico (AIB) sobre a TM do porta-enxerto de macieira Marubakaido poderia ser explicada pela baixa mobilidade do AIB no tecido vegetal, o que interferiria em seu transporte a partir dos sítios de absorção para outros locais da parte aérea (WOLTERING *et al.*, 1995), ou ainda, pela baixa eficiência com a qual o AIB inibe a biossíntese do etileno em outros sistemas.

Quando usado em altas concentrações, o AIB torna-se tóxico para os tecidos vegetais, como tem sido constatado em experimentos realizados com partes aéreas decapitadas de rosa (*Rosa hybrida*) (GASPAR *et al.*, 1989), o que impede sua utilização em concentrações elevadas o suficiente para inibir significativamente a produção do etileno.

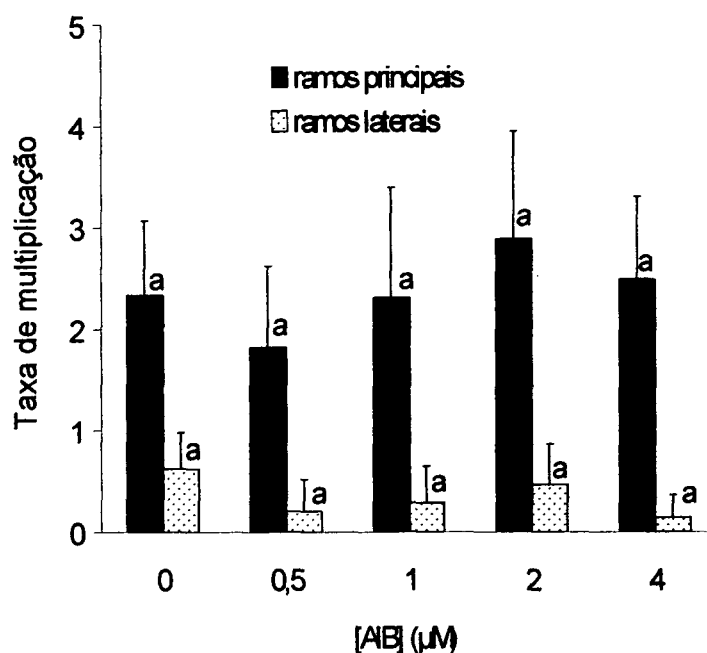


FIGURA 27. EFEITO DO ÁCIDO α -AMINOISOBUTÍRICO (AIB) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.2 INIBIDORES DO MECANISMO DE AÇÃO DO ETILENO

4.3.2.1 Tiosulfato de prata (STS)

A Figura 28 mostra o efeito do tiosulfato de prata (STS) sobre a taxa de multiplicação (TM) associada aos ramos principais e laterais primários. Para os ramos principais, houve redução significativa ($p=0,05$) na TM em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle, tendo sido o efeito diretamente proporcional à concentração de STS empregada no meio de cultura. Para a TM associada aos ramos laterais primários, não houve diferença estatística ($p=0,05$) entre as médias encontradas para partes aéreas, crescidas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS.

Estes resultados se assemelham aos resultados obtidos para *H. speciosa* (PEREIRA-NETTO e McCOWN, 1999), onde redução na taxa de multiplicação mostrou-se associada à presença de tiosulfato de prata (STS) no meio de cultura, em todas as concentrações testadas.

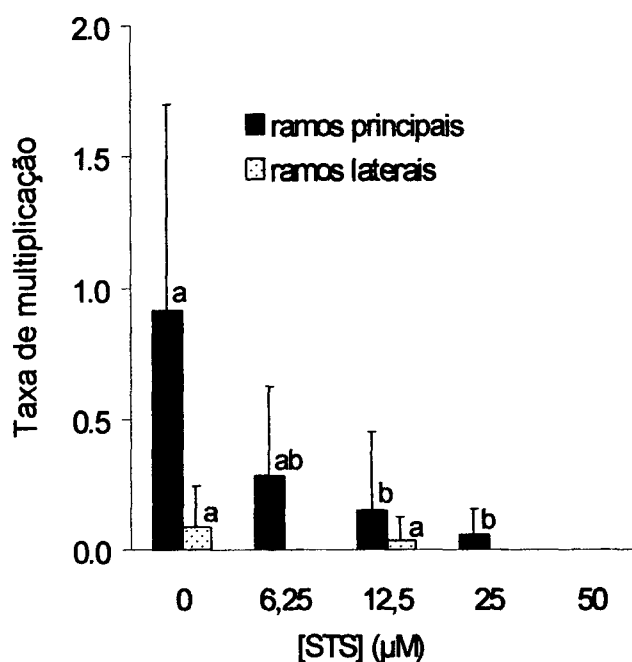


FIGURA 28. EFEITO DO TIOSSULFATO DE PRATA (STS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.2.2 1-Metilciclopropano (1-MCP)

Os resultados obtidos mostraram redução na TM associada aos ramos principais em todas as concentrações de 1-metilciclopropano (1-MCP) testadas, quando comparadas ao controle (Figura 29), sendo esta redução estatisticamente significativa em nível de 5 % de probabilidade.

Quanto a TM associada aos ramos laterais primários, ocorreu redução em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle, apesar de não ter havido redução significativa entre os tratamentos ($p=0,05$) (Figura 29). Estes resultados não confirmam os resultados obtidos por PEREIRA-NETTO e McCOWN (1999) para *H. speciosa*, onde o tratamento com 90 nanolitros por litro de 1-MCP resultou em um incremento de 72 % na taxa de multiplicação.

Estes dados, juntamente com os resultados obtidos nos testes onde se empregou o STS, indicam que, uma possível inibição do mecanismo de ação do etileno resulta em inibição do alongamento dos ramos principais e dos ramos laterais no porta-enxerto de macieira Marubakaido, trazendo como consequência, redução na TM para o porta-enxerto, quando crescendo *in vitro*.

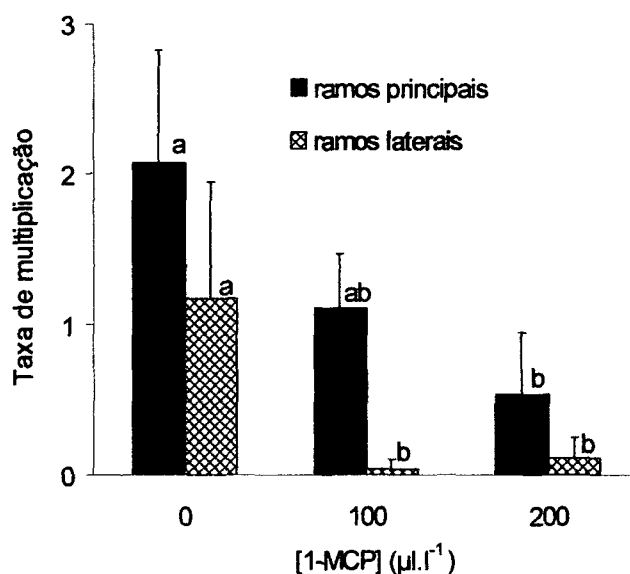


FIGURA 29. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPANO (1-MCP) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.3 BRASSINOESTERÓIDES

4.3.3.1 28-Homoetil-5-flúor-castasterona (5F-HCTS)

Ao contrário do que foi observado para a forma não fluoretada do 28-homoetil-5-flúor-castasterona, explantes tratados com 1 e 10 $\mu\text{g.parte aérea}^{-1}$ de 5F-HCTS apresentaram aumento na TM, tanto para ramos principais quanto para ramos laterais primários, tendo sido este aumento mais expressivo para a dose de 1 $\mu\text{g.parte aérea}^{-1}$ de 5F-HCTS, para a qual observou-se a formação de 4,2 novos explantes por parte aérea, enquanto que para o controle obteve-se 2,3 novos explantes por parte aérea. (Figura 30).

Estes resultados estão de acordo com trabalho realizado por KAMURO e TAKATSUTO (1999), onde os brassinoesteróides estimularam o alongamento e a divisão celular, resultando no alongamento e na ramificação de internódios, sendo estas alterações morfológicas dependentes da concentração da molécula usada. Os resultados encontrados neste experimento também confirmam os resultados encontrados por GREGORY (1981), GREGORY e MANDAVA (1982), MANDAVA e THOMPSON (1983) e MANDAVA *et al.* (1987), nos quais o brassinoesteróide brassinolídio foi aplicado em hipocótilo de feijão mungo, promovendo crescimento. A aplicação do brassinolídio em plantas como alface, pepino, mostarda e trigo cultivado em hidroponia também tem contribuído para o crescimento total da planta (GREGORY, 1981; BRAUN e WILD, 1984).

Embora o teste de Tukey não tenha mostrado diferenças estatisticamente significativas em nível de 5 % de probabilidade, o aumento de 83% para a TM associada aos ramos principais, e de 64% para a TM associada aos ramos laterais primários, comparados ao controle, indica que o 5F-HCTS apresenta potencial para ser empregado como uma ferramenta para o aprimoramento da técnica de propagação do porta-enxerto de macieira Marubakaido utilizado neste estudo.

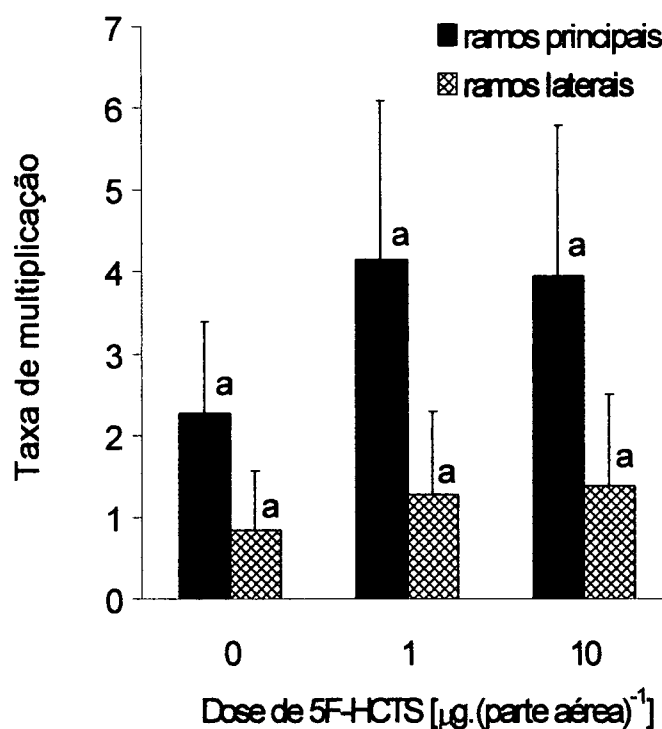


FIGURA 30. EFEITO DA 28-HOMOETIL-5-FLÚOR-CASTASTERONA (5F-HCTS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

4.3.3.2 28-homoetilcastasterona (28-HCTS)

As avaliações realizadas mostraram que houve redução na TM, diretamente proporcional à dose do brassinoesteróide empregado, associada tanto aos ramos principais quanto aos ramos laterais primários para partes aéreas tratadas com o 28-homoetilcastasterona (28-HCTS), nas duas concentrações testadas (1 e 10 $\mu\text{g. parte aérea}^{-1}$). Todavia, esta redução na TM não se mostrou estatisticamente significativa, quando comparada ao controle, em nível de 5% de probabilidade (Figura 31).

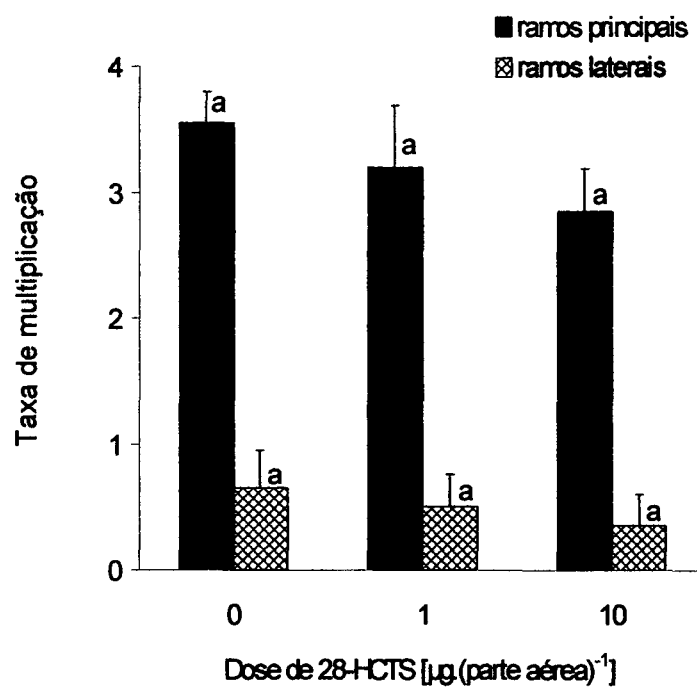


FIGURA 31. EFEITO DA 28-HOMOETILCASTASTERONA (28-HCTS) SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DOS RAMOS PRINCIPAIS E LATERAIS PRIMÁRIOS.

5 CONCLUSÕES

- 1- Os resultados dos experimentos realizados com os inibidores da biossíntese do etileno AVG, AIB e CoCl_2 mostram que, nas concentrações testadas, os mesmos não mostraram-se capazes de aumentar a taxa de multiplicação *in vitro*, indicando que uma potencial inibição da biossíntese do etileno não estimula a proliferação de brotações laterais úteis para fins de micropropagação no porta-enxerto de macieira Marubakaido.
- 2- Para os inibidores do mecanismo de ação do etileno STS e 1-MCP, os resultados não foram satisfatórios, nas concentrações testadas, para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro*, indicando que uma potencial inibição do mecanismo de ação do etileno não estimula a proliferação de brotações laterais no porta-enxerto de macieira Marubakaido.
- 3- O brassinoesteróide 28-HCTS, um provável estimulador da biossíntese do etileno, foi ineficiente no sentido de aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido.
- 4- O brassinoesteróide 5F-HCTS, de maneira diferente de sua forma nativa 28-HCTS, aumentou significativamente a taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido, demonstrando que o mesmo apresenta potencial para ser empregado como uma ferramenta no aprimoramento da técnica de propagação *in vitro* do porta-enxerto utilizado neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. Brassinosteróides: um novo grupo de fito-hormonas. **Quím. Nova**, São Paulo, SP, v.14, p.44-48, 1991.
- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT Jr., M.E. **Ethylene in plant biology**. San Diego: Academic Press, 1992.
- ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1- aminocyclopropane-1- carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine in the conversion of methionine to ethylene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, DC, v. 76, p. 170-74, 1979.
- ADAM, G.; MARQUARDT, V. Brassinosteroids. **Phytochemistry**, Oxford-UK, v. 25, p.1787-1799, 1986.
- APELBAUM, A. *et al.* Inhibition of the conversion of aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. **Plant Physiol.**, Linthicum- MD, v. 67, p.74-79, 1981.
- ARTECA, R. Hormonal Stimulation of Ethylene Biosynthesis. In: FLORES, H.E.; ARTECA, R.N.; SHANNON, J.C. (eds). Polyamines and ethylene: biochemistry, physiology and interactions, **American Society of Plant Physiologists**, 1990. p.216-223.
- ARTECA, R.N.; TSAI, D.S. *et al.* The effects of brassinosteroid on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.59, p.539-544, 1983.
- ARTECA, R.N.; BACHMAN, J.M. The effects of brassinosteroid and indole-3-acetic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase in etiolated mung bean hypocotyl segments. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.75, p.43, 1984.
- ARTECA, R.N. Brassinosteroids. In **Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Ed. P. J Davies, Dordrecht : Kluwer. 2 nd ed. p.206-213.1995.
- BAKER, E.; LIEBERMAN, M.; ANDERSON, J.D. Inhibition of ethylene production in fruit slices by rhizobitoxine analog and free radical scavengers. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.61, p.886- 888, 1978.
- BEYER, E.M.; MORGAN, P.W.; YANG, S.F. Ethylene. In: WILKINS, M.B.(ed.) **Advanced plant physiology**. 6 ed. London: Pitman, 1984. p.11-12.
- BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v.11, p.173-187, 1992.

BOLLER, T.; HERNER, R.C.; KENDE, H. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Planta**, Germany, v.145, p.293- 303, 1979.

BRAUN, P.; WILD, A. The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. **J. Plant Physiol.**, Stuttgart, v.116, p.189-196, 1984.

BURG, S. P. Ethylene, Plant senescence and abscission. **Plant Physiol.**, Linthicun-MD, v.43, p.1503- 1511, 1968.

BURG, S.P.; BURG, E.A. Auxin stimulated ethylene formation: Its relationship to auxin inhibited growth, root geotropism and other plant processes. In: WIGHTMAN, F.; SETTERFIELD, G. (Ed.). **Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances**. Ottawa: Runge Press., 1968a. p.1275-1294.

CHÉE, R. Micropropagation: can nurserymen afford to ignore it ? **Am. Nurseryman**. v.159, n.8, p.89-103, 1984.

CLINE, M.G. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.90, p.230-237, 1994.

CLINE, M.G. Apical dominance. **Bot. Rev.**, New York, v. 57, p. 318-358, 1991.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

CURRY, E.A.; WILLIAMS, M.W. Physiological changes associated with increased lateral branching of apple trees treated with aminoethoxyvinylglycine. **J.Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v.111, p.237-240, 1986.

DAVID, A. In vitro propagation of gymnosperms. In: BONGA, J.M.; DURZAN, J.D. **Tissue Cult. in Forestry**, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.72-104.

ELFVING, D.C. Factors Affecting Apple-tree Response to Chemical Branch-induction Treatments. **J. Amer. Soc. Sci.**, v.109, n.4, p.476-481, 1984.

ENGLISH, P.J. *et al.* Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. **Plant Physiol.**, Linth-MD, v.109, p.1435-1440, 1995.

FAO Production Yearbook 1990, Rome, v. 44, p.159-160, 1991.

FACHINELLO, J.C.; LUCHESI, A.A.; GUTIERREZ, L.E. Influência do anelamento na nutrição e no enraizamento de estacas lenhosas do porta-enxerto *Malling-Merton 106*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.9, p.1025-1031, 1988.

FORSHEY, C.G. Branching responses of young apple trees to applications of 6-benzylamino

purine and gibberellin A4+7. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v.107, n.4, p.538-541, 1982.

FORTES, G. R. L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. Viçosa, 1992. 158f. Dissertação de Doutorado-Universidade Federal de Viçosa.

FUJIOKA, S.; SAKURAI, A. Brassinosteroids. **Nat. Prod. Rep.**, London, v.14, p.100-101, 1997.

GASPAR, T. *et al.* Ethylene production in relation to rose micropropagation through axillary budding. In: CLIJSTERS, H. *et al.* (Eds.). **Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.303-312.

GONZÁLEZ, A. *et al.* Ethylene involvement in *in vitro* organogenesis and plant growth of *Populus tremula* L. **Plant Growth Regul.**, Dordrecht, v.22, p.1-6, 1997.

GOLDING, J.B. *et al.* Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.14, p.87-98, 1998.

GREGORY, L. E. Acceleration of plant growth through seed treatment with brassins. **Am. J. Bot.**, Columbus, v.68, p.586-588, 1981.

GREGORY, L.E.; MANDAVA, N.B. The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.54, p.239-243, 1982.

GREENE, W.D. Some effects of AVG on fruit set, fruit characteristics, and vegetative growth of apple trees. **J. Soc. Hort. Sci.**, Amherst, v.108, n.3, p.410-415, 1983.

GROVE, M.D. *et al.* Brassinolide: a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. **Nature**, Lond., v.281, p.216-217, 1979.

HEINICKE, D.R. High density apple orchards-planning, training and pruning. U.S. Dept. Agr. Handb.v.458, p.1-34. 1975.

HENTSCHKE, R. **Fruticultura de clima temperado; relatório-1991**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. 25p. (EPAGRI. Relatório Interno, 1).

HENTSCHKE, R. **Maçã: estudo da situação catarinense frente ao MERCOSUL**. Florianópolis, Empresa de Pesquisa Agropecuária, 1994. 70p. (Documento nº 148).

INFANTE, R.; MAGNANINI, E.; RIGHETTI, B. The role of light and CO₂ in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* *in vitro*. **Physiol. Plant.**, Linthicum-MD, v.77, p.191-195, 1989.

KAMURO, Y.; TAKATSUTO, S. Pratical Application of Brassinosteroids in Agricultural Fields. In: SAKURAI, A.; YOKOTA, T.S.; CLOUSE, D. (Eds.). **Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones**. Tokyo:1999.

KERBAUY, G.B. **Clonagem de plantas *in vitro***. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 1: p. 30-37, 1997.

KORBAN, S.S.; SKIRVIN, R.M. Nomenclature of the cultivated apple. **Hortscience**, Alexandria, v.19, n.2 , p.177-180, 1984.

JOHN, P. Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane -1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.100, p.583-592, 1997.

JONES, O.P.; HADLOW, C.C.W. Juvenile-like character of apple trees produced by grafting scions and rootstocks produce by micropropagation. **J. Hortic. Sci.**, Kent, v. 64, n.4, p.395-401, 1989.

JONES, O.P. Micropropagation of strawberry and temperate fruit trees. Proceedings of the Institute of Horticulture Symposium: Micropropagation in Horticulture. **Practice and Comercial Problems**. University of Nottingham, March, 1986. p.85-96.

LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; FABBRI, A. In vitro axillary shoot proliferation of apple rootstocks under different ethylene conditions. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, Columbia, v.33, p.70-74, 1997.

LEMONS, P.E.E.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. **J. Hortic. Sci.**, Kent, v.72, n.1, p.721-728, 1996.

LIEBERMAN, M. Biosynthesis and action of ethylene. **Annu Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.30, p.533-591, 1979.

LOONEY, N.E. Growth regulator use in commercial apple production. In: SKOOG, F. (Ed.). **Plant growth substances**. Berlin: Springer-Verlag., p.409-418, 1980.

MA, H.J. *et al.* Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. **Plant Cell Rep.**, Berlin, v.17, p.211-214 , 1998.

MACKEON, J.C.; MACULET, F.C.J.; YANG, S.F. Biosynthesis and Metabolism of Ethylene. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones- Physiology, Biochemistry and molecular Biology**. 2 nd Ed.: Kluwer Academic Publishers,1995. p.118-139.

MANDAVA, N.B. Plant growth-promoting brassinosteroids. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, v.39, p.23-52, 1988.

MANDAVA, N. B.; SASSE, J.M. Brassinolide, a growth promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.53, p.453-461, 1981.

MANDAVA, N.B.; THOMPSON, M.J. Chemistry and functions of brassinolide. In: Nes, W.D.; FULLER, G.; Tsai, L-S. ed. **Proceedings of the Isopentenoid Symposium**, New York, p. 401-431, 1983.

MANDAVA, N.B.; THOMPSON, M.J.; YOPP, J.H. Effects of selected putative inhibitors of RNA and protein synthesis on brassinosteroid-induced growth in mung bean epicotyls. **J. Plant. Physiol.**, Stuttgart, v.128, p.63-68, 1987.

MARTIN, G. C. Apical dominance. **Hortscience**, Alexandria, v. 22 , p. 824-833, 1987.

MATTHYS, D.; GIELIS, J.; DEBERGH, P. Ethylene. In: AITKEN, C. J.; KOZAL, T.; SMITH, L.(Ed.) **Automation and enviromental control in plant tissue culture**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.473-491, 1995.

MILLER, C.O. Promoting effect of cobaltous and nickelous ions on expansion of etiolated bean leaf discs. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.32, p. 216-18, 1951.

MULKEY, T.J.; KUZMANOFF, K.M.; EVANS, L.M. Promotion of growth and hydrogen ion efflux by auxin in roots of maize pretreated with ethylene biosynthesis inhibitors. **Plant Physiol.**, Linthicun-MD, v.70, p.186-188, 1982.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, n.15, p.473-497, 1962.

NAKATSUKA, A.; SHIOMI, S.; INABA, A. Expression and internal feedback regulation of ACC syntase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v.38, p.1103-1110, 1997.

NICHOLS, R.; KOFRANEK, A.M. Reversal of ethylene inhibition of tulip stem elongation by silver thiosulphate. **Sci. Hortic.**, Amsterdam, v.17, p.71-79 , 1982.

OCHATT, J.S.; CASO, H.O. *In vitro* meristem of M.4 apple (*Malus pumila* Mill.). I. Optimal nutrient medium. Netherlands. W. Junk Publishers. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, The Hague, v. 2, p.39-48, 1983.

OSBORNE, J. D. The control role ethylene in plant growth and development. In: CLIJSTER, H. *et al.* (eds), Biochemical and Physiological aspects of production in lower and higher plants. Kluwer Academic Publishers, Oxford, 1989. p.1-11.

PEREIRA-NETTO, A.B. **Thermally and chemically-induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa*: physiological basis and use in micropropagation.** Madison, 1996. Dissertação (Doutorado em Horticultura e Botânica). University of Wisconsin-Madison.

PEREIRA-NETTO, A. B.; McCOWN, B.H. Thermally and chemically-induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. **Tree Physiology**, Victoria-Canada, v.19, p.733-740, 1999.

PINAZZA, A.L. Especial Fruticultura. **Agroanalysis**. Rio de Janeiro: FGV, v.19, p.12. 1999.

PORAT, R. *et al.* A increase in ethylene sensitivity following pollination is the initial event triggering an increase in ethylene production and enhanced senescence of *Phalaenopsis* orchid flowers. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.93, p.778-784, 1995a.

PORAT, R. *et al.* 1-ethylcyclopropene inhibits ethylene action in cut Plox flowers. (In press). 1995b.

QUINLAN, J.D.; PRESTON, A.P. The use of branching agents to replace hand pruning of young trees of Bramley's seedling apple. **J. Hortic. Sci.**, Kent, v.53, p.39-43, 1978.

RIBAS, F.L.L. **Micropropagação e Estudo da Parada de Crescimento Durante a Aclimatização de Mudanças de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) CV. Gala, Clone FZ.** Curitiba, 1991. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RIGHETTI, B. *et al.* Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. **Plant.**, v.78, p.507-510, 1990.

RIOV, J.; GOREN, R. Effect of ethylene on auxin transport and metabolism in midrib sections in relation to leaf abscission of woody plants. **Plant Cell Environ.**, v. 2, p.83-89, 1979.

RUSSEL, W.; THIMANN, K.V. The second messenger in apical dominance controlled by auxin. In: PHARIS, R.P.; ROOD, S.B. (Ed.). **Plant growth substances**. New York: Springer-Verlag, 1988. p.419-427.

SALTVEIT Jr., M.E.; YANG, S.F. Ethylene. In: RIVIER, L.; CROZIER, A. (Ed.). **The principles and practice of plant hormone analysis**. London: Academic Press, 1987. p.367-401.

SANDERS, I. O.; SMITH, A. R.; HALL, M. A. Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. **Planta**, Heidelberg, n.179, p.104-114, 1989.

SANKHLA, D.; SANKHLA, N.; DAVIS, D.T. Promotion of *in vitro* shoot formation from excised roots of silktree (*Albizia julibrissin*) by an oxime ether derivative and other ethylene inhibitors. **Plant Cell Rep.**, v.15, p.143-146, 1995.

SATOH, S.; ESASHI, Y. α -Aminoisobutyric acid: a probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 21, p. 939-49, 1980.

SATOH, S.; ESASHI, Y. Alpha aminoisobutyric acid, propyl gallate and cobalt ion and the mode of inhibition of ethylene production by cotyledonary segments of cocklebur seeds. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.57, p. 521-526, 1983.

SATOH, S.; ESASHI, Y. Effects of α -aminoisobutyric acid and D-and L-amino acids on ethylene production and content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in cotyledonary segments of cocklebur seeds. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 54, p. 147-52, 1982.

SCHUCH, W.M. **Micropropagação de Macieira Cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh).** Pelotas:1989. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Fruticultura de Clima Temperado)-Universidade Federal de Pelotas.

SCHLAGNHAUFER, C.D.; ARTECA, N.R. Inhibition of brassinosteroid-induced epinasty in tomato plants by aminooxyacetic acid and CO₂. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.65, p.151-155, 1985.

SEREK, M.; SISLER, E.C.; REID, M.S. Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. **Plant Growth Regulation**, v.16, p.93-97, 1994a.

SEREK, M.; SISLER, E.C.; REID, M.S. Novel gaseous inhibitor of ethylene binding prevents ethylene effects in potted flowering plants. **J. Amer. Soc. Horticulturæ**, v. 119, p.1230-1233, 1994b.

SEREK, M.; SISLER, E.C.; REID, S.M. 1-Methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor of ethylene action, improves the life of fruits, cut flowers and potted plants. **Acta Hort.**, The Hague, v.394, p.337-345, 1995.

SETHI, U.; BASU, A.; MUKHERJEE, S.G. Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in *Brassica* hypocotyl explants. **Plant Sci.**, v.69, p.225-229, 1990.

SINGH, H.; BHARDWAJ, T.R. Brassinosteroids. **J. Chem. Sect B Org. Chem. Incl. Med. Chem.**, New Delhi, v.25, p.989-998, 1986.

SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.100, p.577-582, 1997.

SISLER, E.C.; DUPILLE, E.; SEREK, M. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. **Plant Growth Regulation**. Dordrecht, v.18, p.79-86, 1996a.

SISLER, C.E.; SEREK, M.; DUPILLE, E. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. **Plant Growth Regulation**. Dordrecht, v.18, p.169-174, 1996b.

SISLER, E.C. Ethylene-binding components in plants. In: MATTO, A.K.; SUTLE, J.C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton, 1991. p.81-99.

SMITH, R. A.; HALL, A. M. Biosynthesis And Metabolism of Ethylene. In: CROZIER, A.; HILLMAN, J.R. (Ed.). **The biosynthesis and metabolism of plant hormones**. Cambridge University Press, Cambridge.1984. p.201-29.

SPIKMAN, G. Development and ethylene production of buds and florets of cut freesia inflorescences as influenced by silver thiosulfate, aminoethoxyvinylglycine and sucrose. **Scientia Hort.**, v.39, p.73-81, 1989.

TAKATSUTO, S. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas-chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.658, p.3-15, 1994.

TAMAS, I.A. Hormonal regulation of apical dominance. In: DAVIES, P. J. (Ed.), **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 1987. p. 393-410.

THIMANN, K.V. Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. V. The effects of cobalt and other metals. **Am. J. Bot.**, Columbus, v.43, p.241-50, 1956.

VEEN, H.; OVERBEEK, J.H.M. The action of silver thiosulphate in carnation petals. In: CLIJSTERS, H. *et al.* (Ed.). **Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants**. 1989. p.109-117.

VIOQUE, B.; CASTELLANO, J.M. Extraction and biochemical characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from pear. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.90, p.334-338, 1994.

WANG, T.; COSGROVE, D.J.; ARTECA, R.N. Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv Lei-Choi). **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.101, p.965-968, 1993.

WENZEL, A.A. *et al.* Aminoethoxyvinylglycine, cobalt and ascorbic acid all reduce ozone toxicity in mung beans by inhibition of ethylene biosynthesis. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.93. p.286-290, 1995.

WILLIAMS, M.W. Retention of fruit firmness and increase in vegetative growth and fruit set of apples with aminoethoxyvinylglycine. **Hortscience**, Alexandria, v.15, p.76-77, 1980.

WILKINS, C.P. *et al.* Tissue culture propagation of trees. **Outlook Agri.**, v.14, n.1, p.1-13, 1985.

WOLTERING, E.J.; SOMHORST, D.; van de VEER, P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence. **Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v.109, p.1219-1225, 1995.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol.**, Linthicum-MD, v. 35, p.155-189, 1984.

YEANG, H.Y.; HILLMAN, J.R. Control of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. by ethylene in the apical shoot. **J. Exp. Bot.**, v.32, p.395-404, 1981.

YEANG, H.Y.; HILLMAN, J.R. Ethylene and apical dominance. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 60, p.275- 282, 1984.

YOPP, J.H.; MANDAVA, N.B.; SASSE, J.M. Brassinolide a growth promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin biossays. **Plant Physiol.**, Linthicun-MD, v.33, p.445-452, 1979.

YOUNG, Y.H.; HILLMAN, J.R. Control of Lateral Bud Growth in *Phaseolus vulgaris* L. by Ethylene in the Apical Shoot. **J. Exp. Bot.**, Kuala Lumpur, v. 32, n.127, p.395-404, 1981.

YU, Y.B.; YANG, S.F. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinilglycine and cobalt ion. **Plant Physiol.**, Linthicun-MD, v. 64, p.1074-1077, 1979.

ZANOL, G.C.; FORTES, G.R.L.; CAMPOS, A.D.; SILVA, J.B.; CENTELLAS, A.Q. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira *Marubakaido* tratado com ácido indolbutírico e floroglucinol. **Revista Bras. de fisiologia Vegetal**, Brasília, v.10, n.1, p. 65-68, 1996.

ZIESLIN, N.; HALEVY, A.H. The interaction between growth in rose plants: I. The effects of different of plant parts (correlative inhibition). **Bot. Gaz.**, Chicago, v.137, p.291-296, 1976.

ZULLO, T.A.M. BRASSINOSTERÓIDES. Apostila. Centro de Genética, Biologia e Fitoquímica, Instituto Agronômico. Campinas, SP. p.1-52, 1999.